

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Evaluación de la dinámica poblacional en especies simpátricas de
Polylepis en el Páramo de la Virgen, provincia de Napo y Pichincha
mediante marcadores moleculares

Disertación previa a la obtención del título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

STEPHANY DANIELA VILLOTA VILLAFUERTE

QUITO, 2012

CERTIFICACIÓN

Yo, Alexandra Narváez M.Sc., Directora de la Disertación, CERTIFICO: que la Srta. Stephany Daniela Villota Villafuerte ha realizado la investigación sobre el tema: “Evaluación de la dinámica poblacional en especies simpátricas de *Polylepis* en el Páramo de la Virgen, Provincia de Napo y Pichincha mediante marcadores moleculares”, de conformidad a las normas y técnicas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

M.Sc. Alexandra Narváez

Directora de la Disertación

Quito, Mayo 2012

A mis padres,

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mis padres que con su ejemplo de esfuerzo y trabajo duro hacen que cada día seamos mejores personas. A mis hermanos, Andrea y Sebastián, por su cariño incondicional, paciencia, confianza y aliento. Por escucharme y alentarme cada día a seguir adelante. Sin todos ustedes no hubiera sido posible culminar esta etapa de mi vida.

A Alexandra Narváez M.Sc. por darme la oportunidad de ser parte del laboratorio y de realizar este trabajo, por su ayuda, paciencia y guía durante la realización del mismo.

A Susana León M.Sc y Rommel Montufar Dr., por sus comentarios y sugerencias que contribuyeron a enriquecer el contenido de esta investigación.

A Carolina Portero por su amistad, confianza, apoyo y entrega constantes e incondicionales. Por su guía, paciencia, enseñanzas, persistencia y siempre haber creído en mi. Por esas palabras de aliento que permitieron la culminación de este trabajo.

A Ana Troya por su tiempo, dedicación, interés, y ayuda tanto en la fase de campo como de laboratorio. Por su conocimiento y observaciones que encaminaron esta investigación.

A Esteban Orellana por su amistad, cariño, observaciones y ayuda. Por ayudarme a encontrar soluciones y alentarme a seguir adelante.

A Andrea Villota, Diana Pazmiño, Diego Alarcón, Natalia Andrade, Pedro Barba, Diana Bautista, Alejandro Janeta, Liliana Jaramillo, Verónica Mendez, Patricia Mora, Isabel Ojeda, Diego Ortiz, Diego Páez, Ana Salgado, Verónica Saenz, y todos aquellos amigos que estuvieron ahí cuando más los necesitaba. Por su amistad, comentarios, sugerencias, paciencia y sobre todo, por escuchar.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. ANTECEDENTES.....	3
3.2. Polylepis RUIZ & PAVÓN (ROSACEAE: SANGUISORBEAE)	3
3.2.1. ORIGEN.....	3
3.2.2. TAXONOMÍA	4
3.2.3. ESPECIES HÍBRIDAS	6
3.2.4. INTROGRESIÓN Y FLUJO GÉNICO	7
3.3. MARCADORES MOLECULARES	8
3.3.1. GENERALIDADES.....	8
3.3.2. MARCADORES MICROSATÉLITES	8
3.3.3. SECUENCIA ENTRE REPETICIONES SIMPLES (ISSRs)	9
3.4. JUSTIFICACIÓN	10
3.5. OBJETIVOS	10
3.5.1. GENERAL	10
3.5.2. ESPECÍFICOS	11
4. MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS	12
4.1.1. SITIOS DE COLECCIÓN	12
4.1.2. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS	12
4.1.3. MÉTODO DE COLECCIÓN.....	13
4.2. EXTRACCIÓN DE ADN	13

4.2.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN.....	13
4.2.2. CUANTIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE CALIDAD DE ADN.....	14
4.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	15
4.3.1. INICIADORES UTILIZADOS.....	15
4.3.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	15
4.3.3. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN.....	16
4.3.4. VERIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS.....	16
4.4. VISUALIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS.....	16
4.4.1. ARMADO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS.....	17
4.4.2. CONDICIONES DE MIGRACIÓN.....	17
4.4.3. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR.....	18
4.4.4. TINCIÓN PLATA.....	18
4.5. AMPLIFICACIÓN DE ISSR's.....	19
4.5.1. INICIADORES UTILIZADOS.....	19
4.5.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN.....	19
4.5.3. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN.....	20
4.5.4. VISUALIZACIÓN DE POLIMORFISMOS.....	20
4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
4.6.1. MICROSATÉLITES.....	21
4.6.1.1. <u>ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA</u>	22
4.6.1.1.1.FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	22
4.6.1.1.2.HETEROCIGOSIDAD.....	22
4.6.1.1.3.ESTIMACIÓN DE POLIPLOIDÍA.....	22
4.6.1.1.4.EVENNESS.....	23

4.6.1.2. <u>ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL</u>	23
4.6.1.2.1. F_{ST}	23
4.6.1.2.2. PORCENTAJE DE PERTENENCIA POBLACIONAL.....	24
4.6.1.2.3. ANÁLISIS DE VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA).....	25
4.6.1.3. <u>DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES</u>	25
4.6.1.3.1. DISTANCIA DE LYNCH (1990).....	25
4.6.1.3.2. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA).....	26
4.6.2. ISSR's.....	26
4.6.2.1. <u>ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA</u>	27
4.6.2.1.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS.....	27
4.6.2.1.2. PORCENTAJE DE LOCI POLIMÓRFICOS.....	28
4.6.2.1.3. DIVERSIDAD DE NEI (1973).....	28
4.6.2.2. <u>ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL</u>	28
4.6.2.2.1. G_{ST}	28
4.6.2.2.2. ANÁLISIS DE VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA).....	29
4.6.2.3. <u>DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES</u>	29
4.6.2.3.1. DISTANCIA GENÉTICA DE NEI (1972).....	29
4.6.2.3.2. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA).....	30
5. RESULTADOS	31
5.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	31
5.2. EXTRACCIÓN DE ADN.....	31
5.3. AMPLIFICACIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MEDIANTE MICROSATÉLITES.....	32
5.4. AMPLIFICACIÓN DE ISSR's.....	32
5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	33

5.5.1. MICROSATÉLITES	33
5.5.1.1. <u>ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA</u>	33
5.5.1.2. <u>ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL</u>	34
5.5.1.3. <u>DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES</u>	35
5.5.2. ISSR's.....	35
5.5.2.1. <u>ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA</u>	35
5.5.2.2. <u>ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL</u>	36
5.5.2.3. <u>DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES</u>	37
6. DISCUSIÓN	38
6.1. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	38
6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA	39
6.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL	41
7. CONCLUSIONES	47
8. LITERATURA CITADA	49
9. FIGURAS	60
10. TABLAS	68
11. ANEXOS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sitios de colección en el páramo de la Virgen	61
Figura 2. Localidad SV1	62
Figura 3. Localidad SV2.....	62
Figura 4. Verificación de extracción de ADN en un gel de agarosa al 0,8%	63
Figura 5. Visualización de polimorfismos de SSR's en geles de acrilamida	64
Figura 6. Verificación de la amplificación de ISSR 17898-B, gel de agarosa al 2,5%.....	65
Figura 7. PCoA SSR's a partir de matriz de distancia de Lynch	66
Figura 8. PCoA ISSR's a partir de matriz de distancia de Nei.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Individuos utilizados para el análisis molecular con SSRs e ISSRs.	69
Tabla 2. Cantidad ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$) y calidad de ADN de cada individuo.....	75
Tabla 3. Características de los iniciadores de microsatélites.....	82
Tabla 4. Individuos amplificados con iniciadores ISSRs (844-A y 17898-B).	83
Tabla 5. Características de los iniciadores de ISSR's	84
Tabla 6. Alelos encontrados tras la amplificación de cinco loci de microsatélites	84
Tabla 7. Índice de fijación (F_{ST}) para las especies (SSRs)	85
Tabla 8. Análisis de diversidad genética para SSR's.	85
Tabla 9. Nivel de poliploidía estimado.....	86
Tabla 10. Porcentaje de pertenencia de cada individuo.....	91
Tabla 11. Análisis de la Variación Molecular (AMOVA) de los SSRs	96
Tabla 12. Estadísticos descriptivos para ISSR's	96
Tabla 13. Patrones de bandas totales para ISSR's.....	96
Tabla 14. Diversidad genética (Nei, 1973) obtenida a partir de ISSR's.	97
Tabla 15. Análisis de la Variación Molecular (AMOVA) de los ISSRs	97

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Reactivos	99
Anexo 2. Glosario	103

1. RESUMEN

Los bosques de *Polylepis* (Rosaceae) son la vegetación arbórea dominante en los páramos de los Andes. Este, es un género aloploiploide cuyo número cromosómico aún no se ha determinado con exactitud y que, se presume, puede variar entre poblaciones de la misma especie. Además, se ha reportado que este tipo de individuos pierden parte de sus cromosomas, la copia de algún progenitor, al reacomodar su genoma; por lo que la determinación de parentales puede ser difícil. Mediante la amplificación cruzada de marcadores moleculares co-dominantes microsatélites, con cinco iniciadores diseñados para *Fragaria* (Rosaceae), se analizó dos poblaciones simpátricas de *P. incana* y *P. pauta* en el páramo de la Virgen, provincias de Pichincha y Napo, Ecuador. Adicionalmente, se amplificaron dos iniciadores de marcadores moleculares dominantes de secuencias entre repeticiones simples (ISSRs). Estos análisis demuestran que la diversidad intra-poblacional es mayor que la inter-poblacional. Además, hay una tendencia a la homogenización de las poblaciones a causa de esta baja diferenciación, posiblemente debido a un alto flujo génico ($Nm: 3,65$) por la capacidad de dispersión de polen. La baja variación entre especies y un valor F_{ST} menor a 0,15 permiten inferir un estado de panmixia en las poblaciones. Estos resultados corroboran la hipótesis de Kerr (2004) sobre la presencia de un “complejo de especies” dentro de *Polylepis*. Por otra parte, la poca variación entre localidades puede indicar reciente separación de un mismo bosque y señala que la fragmentación, por procesos antropogénicos, no influye en la dinámica reciente de la población.

Palabras clave: Flujo génico ISSR's microsatélites *Polylepis*

2. ABSTRACT

Polylepis (Rosaceae) forests are the most dominant tree vegetation in the paramo of the Andes. In this allopolyploid genus, no precise chromosome counts are available and, presumably, this number may vary among populations of the same species. It has been reported the sequence elimination phenomenon of the genome in some allopolyploid plants, usually a copy of a parent is deleted to rearrange its genome, making difficult the parenting determination. The use of microsatellite cross-species amplification, with five primers designed for *Fragaria* (Rosaceae), and two inter simple sequence repeats (ISSR) primers permitted the analysis of heterocigosity of two sympatric populations of *P. incana* and *P. pauta* found in the paramo de la Virgen, Ecuador. These analyzes show that intra-population diversity is greater than inter-population diversity, and that there is a tendency towards homogenization of populations as a result of low differentiation, possibly due to high gene flow ($Nm: 3.65$) as there is evidence that wind-pollinated *Polylepis* can disperse pollen over large distances. At the same time, low variation between species and an F_{ST} value under 0.15 suggests a state of panmixia. These results support the hypothesis of *Polylepis* being an agamic complex (Kerr, 2004). Moreover, the small variation among populations may indicate recent breakup of the patches from a same forest and points out that the fragmentation, due to anthropogenic processes, does not influence the composition of the population.

Key words: Gene flow ISSR Microsatellites *Polylepis*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ANTECEDENTES

Los bosques formados por especies del género *Polylepis* representan hábitats naturales de una gran variedad de mamíferos, aves e insectos (Kessler, 2006). Actualmente, son considerados como uno de los ecosistemas forestales más amenazados del mundo (PNUMA, 2004), debido a procesos antropogénicos como agricultura, pastoreo, tala y quema (Quija-Lamina *et al.*, 2010). Se considera como bosque natural a los individuos que se encuentren entre los 3 700 – 4 200 m.s.n.m. (Cierjacks *et al.*, 2007; Bakker *et al.*, 2008; Hensen *et al.*, 2011).

En las últimas décadas, se ha observado un incremento en la concientización sobre la importancia de este hábitat, reconociendo la necesidad de proteger e incluso restaurar los ecosistemas de bosques de *Polylepis* (Kessler, 2006).

3.2. *Polylepis* RUIZ & PAVÓN (ROSACEAE: SANGUISORBEAE)

3.2.1. ORIGEN

La presencia de características morfológicas, como anteras pubescentes y frutos con espinas o alas, sugieren que *Polylepis* es un género monofilético (Kerr, 2004). Sin embargo, la delimitación de especie es difícil debido a la alta plasticidad morfológica intra e inter poblacional y extensiva hibridación (Simpson 1979, 1986; Romoleroux 1996; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010).

La baja diferenciación genética sugiere que la evolución del género ha ocurrido en los últimos millones de años (Simpson, 1986; Kessler, 1995, Kerr, 2004, Schmidt–Lebuhn, *et al.* 2006b). Kerr (2004), a partir de la amplificación del segmento nuclear de espaciadores internos transcritos (ITS) y alcohol deshidrogenasa 1 (*Adh1*), propone que el género *Polylepis* se desarrolló mediante poliploidización a partir del género ancestral *Acaena*; un evento de hibridación entre *A. elongata* y linajes de *A. cylindristachya*, subsecuentemente, el ancestral *Polylepis quadrijuga* hibridizó nuevamente con el género *Ancistrum* (miembro ancestral de *Acaena*) dando lugar al ancestro de todas las especies restantes de *Polylepis*.

3.2.2. TAXONOMÍA

El género arborescente *Polylepis* (Ruiz y Pavón) consiste de 26 especies de árboles y arbustos polinizados por el viento que crecen en altas elevaciones (3 500–5 200 m.s.n.m.) de los Andes, desde el norte de Venezuela hasta el centro de Argentina y el norte de Chile (Kessler y Schmidt–Lebuhn, 2005; Schmidt–Lebuhn *et al.* 2007; Cierjacks, *et al.* 2007).

En el Ecuador se han identificado siete especies de este género, de éstas, dos son endémicas (*P. lanuginosa* y *P. reticulata*) (Jørgensen y Ulloa Ulloa. 1994).

En el Páramo de la Virgen, provincias de Pichincha y Napo, donde se centra este estudio, Romoleroux (1996) ha reportado la presencia de tres especies:

1. *Polylepis incana* (Kunth, 1824) es una especie representada por árboles pequeños o arbustos, de 5–8 m (Simpson, 1979). Presenta hojas trifoliadas e inflorescencias

pequeñas y colgadas con 3 a 10 flores (Cierjacks, *et al.* 2007). Las hojas y racimos a menudo están cubiertas por pelos glandulares cortos, amarillos y un exudado resinoso. Sus frutos son fusiformes e irregularmente alados (Romoleroux, 1996). Se la encuentra en la ladera occidental entre los 3 500–4 100 m.s.n.m, desde Ecuador central hasta el sur de Perú (Cierjacks, *et al.* 2008).

2. *Polylepis pauta* (Hieron, 1896) son árboles de hasta 12 m, con hojas imparipinadas conformadas por 4 a 6 pares de folíolos. Se cree que sus frutos, irregulares con numerosas espinas delgadas, permiten dispersión ectozoocoria facilitando la diseminación de la especie a través del bosque. Crece en áreas contiguas al bosque montano alto, presenta pocas especializaciones ecológicas y, aparentemente, no puede competir con especies arborescentes de elevaciones más bajas. Presenta características morfológicas como folíolos oblongos u ovados, crenados con la superficie inferior pubescente usualmente restringida a las venas, y largos racimos que permiten una rápida identificación (Romoleroux, 1996). Su distribución es amplia, desde Ecuador hasta el norte de Bolivia (Simpson, 1986; Kessler y Schmidt-Lebuhn, 2006). Prevalece en las laderas orientales, entre los 3 700–4 200 m.s.n.m (Cierjacks, *et al.* 2007).
3. *Polylepis sericea* (Weddell, 1857) árbol o arbusto que puede medir hasta 10 m de altura. Presenta hojas imparipinada con 3 a 7 pares de folíolos y una inflorescencia cimosa. Su fruto presenta una forma irregular más o menos turbinado, piloso, con una gran variedad de protuberancias y espinas gruesas (Simpson, 1979; Romoleroux, 1996). Su distribución latitudinal es la más amplia, va desde Venezuela hasta el centro de Bolivia (entre los 3 500–4 300 m.s.n.m.); su

distribución a lo largo de los Andes en los últimos millones de años puede deberse a cambios climáticos (Azócar, *et al.* 2007; Colmenares, M. 2002).

3.2.3. ESPECIES HÍBRIDAS

El limitante para los planes de conservación de una población del género *Polylepis* es la existencia de un nivel de poliploidía indefinido (Kerr, 2004 y Schmidt-Lebuhn, 2010). El conteo de cromosomas (Quija-Lamina, *et al.*, 2010) plantea la posibilidad de que el nivel de poliploidía es diferente para cada especie de este género (e.g. *P. incana* $2n \sim 40$, *P. pauta* $2n \sim 80$) y que puede variar entre poblaciones de la misma especie (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010). Además, el origen de *Polylepis* deja abierta la probabilidad de encontrar hibridación e introgresión entre las especies (Kerr, 2004).

En Ecuador, Romoleroux (1996) ha encontrado varios híbridos entre especies de *Polylepis*, en especial entre especies simpátricas que, basados en características morfológicas, son el resultado de introgresión. En el sitio de estudio, hay registros de posibles híbridos entre *P. incana* x *P. pauta*, *P. incana* x *P. sericea* y *P. pauta* x *P. sericea*.

- Híbridos *P. incana* x *P. pauta* son individuos que tienen 2–3 pares de folíolos \pm obovados con márgenes serrados–crenados como en *P. incana* mientras la pubescencia es \pm sericeosa (Romoleroux, 1996).
- Híbridos *P. incana* x *P. sericea* son individuos que tienen 2–4 pares de folíolos obovados \pm oblongos con su envés \pm lanoso y estípulas sericeosas (Romoleroux, 1996).

- Híbridos *P. pauta* x *P. sericea* son individuos con foliolos obovados–oblongos a ± lanceolados con márgenes enteros a serrados y un envés sericeo (Romoleroux, 1996).

3.2.4. FLUJO GÉNICO E INTROGRESIÓN

Se han realizado varios intentos por definir la filogenia de *Polylepis*, sin embargo, los resultados han arrojado árboles polifiléticos que se pueden explicar con posibles eventos de introgresión e hibridación (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2007; Kerr, 2004). Esta falta de claridad evolutiva por frecuente hibridación entre especies puede deberse a eventos naturales como dispersión de polen (Quija-Lamina *et al.*, 2010). Por el contrario, a más del evento de introgresión que dio origen al género (*P. quadrijuga* con *Ancistrum* permitiendo la introgresión de su material cloroplástico; Kerr, 2004), no se han reportado más casos entre las especies.

El flujo génico en *Polylepis* se puede dar a partir de la dispersión de polen. Se ha reportado distancias de dispersión de hasta 80 Km., en *P. australis*; polen que se mantiene viable por días (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a). Esta capacidad de dispersión es la que permite el flujo génico entre especies simpátricas. Un claro ejemplo es el caso de *P. crista-galli*, especie que se origina tras eventos de hibridación entre *P. subtusalbida* y el ancestro de *P. neglecta*; ambas especies cercanas geográficamente en los bosques boliviano-tucumanos (sur de Bolivia y norte de Argentina) (Kessler, 2006; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a).

No obstante, se cree que pocos genes son responsables de la separación de especies de *Polylepis*, ya que las barreras de las especies son porosas para la mayoría

del genoma restante (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010). Es por esto que, al parecer, las especies se han estabilizado a través de aislamiento ecológico y/o geográfico para evitar introgresión, ya que se generaría una pérdida de caracteres morfológicos distintivos (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a).

3.3. MARCADORES MOLECULARES

3.3.1. GENERALIDADES

Un marcador molecular es un segmento de ácido desoxiribonucleico (ADN) con una ubicación física identificable en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen, y cuya herencia mendeliana se puede rastrear permitiendo conocer la información genética que los organismos portan (Picca *et al.*, 2002).

Un marcador ideal debe ser: altamente polimórfico, co-dominante, de herencia mendeliana no epistática, no influenciado por el ambiente, de rápida identificación, de simple análisis y con alta reproducibilidad (Picca *et al.*, 2002).

3.3.2. MARCADORES MICROSATÉLITES

Los microsatélites, o repeticiones de secuencia simple (SSR, por sus siglas en inglés), son repeticiones en tándem de secuencias cortas, cuyos motivos de repetición consisten de 1 a 6 nucleótidos que conforman cinco a cerca de 100 repeticiones (Sefc *et al.*, 2001).

Los microsatélites se caracterizan por ser marcadores co-dominantes (permitiendo discriminar entre homocigotos y heterocigotos), altamente polimórficos, abundantes y distribuidos al azar en los genomas (Picca, *et al.*, 2002).

Se los considera selectivamente neutros ya que no se encuentran dentro o cerca de una región codante; ésta es una característica privilegiada para la detección cuantitativa de flujo génico, genética de poblaciones, ecología y estudios filogeográficos (Rong *et al.*, 2004; Wallace y Klein, 2004).

3.3.3. SECUENCIA ENTRE REPETICIONES SIMPLES (ISSRs)

Los marcadores moleculares de secuencia entre repeticiones simples (ISSR, por sus siglas en inglés) son una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que amplifica los segmentos de ADN presentes entre dos regiones de microsatélites idénticas orientadas en direcciones opuestas (IPGRI y Cornell University, 2003). El fragmento amplificado se lo considera un locus, ya que representan el segmento de ADN entre microsatélites (González y Aguirre, 2007).

Esta técnica usa un microsatélite, de entre 16–25 pares de bases (pb) de largo, como iniciador de una reacción de PCR que tiene como objetivo varios loci del genoma. Las repeticiones de microsatélites usadas como iniciadores pueden ser di-, tri-, tetra- o penta-nucleótido (Reddy *et al.*, 2002). Se evita las repeticiones de mononucleótidos para descartar las secuencias presentes en ADN cloroplástico (González y Aguirre, 2007).

Son de gran utilidad ya que no requieren información previa sobre secuencias, analizan varios loci simultáneamente, son específicos de secuencias de microsatélites y son eficientes al realizar perfiles de ADN, especialmente de especies cercanamente relacionadas (IPGRI y Cornell University, 2003). Sin embargo, al ser marcadores dominantes, la homología del tamaño de las bandas es incierta. La detección de

polimorfismos y genotipos es difícil al ser marcadores multilocus (Satya, 2007). Para determinar la heterocigosidad de la población es necesario asumir que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (González y Aguirre, 2007).

3.4. JUSTIFICACIÓN

Debido al desconocimiento de los límites inter-específicos entre especies simpátricas del género *Polylepis*, los planes de manejo no pueden formularse eficazmente. Además, hay registros de hibridación en la zona y un estudio molecular puede demostrar la relación existente entre especies simpátricas (*P. incana*, *P. pauta* y *P. sericea*).

El presente estudio tiene como finalidad evaluar la dinámica dentro y entre poblaciones simpátricas de *Polylepis* spp. en el Páramo de la Virgen (parches de bosque) y aportar con datos sobre la importancia del flujo génico en esta dinámica. Con información sobre la existencia de intercambio genético entre especies simpátricas se puede conocer la incidencia y los posibles riesgos de estrategias de reforestación que usan especies foráneas. Tal es el caso de *P. racemosa*, una especie peruana, o especies no locales por ejemplo, *P. incana* en la localidad del Parque Nacional Cajas en donde predomina *P. lanuginosa*, especie endémica de Ecuador.

3.5. OBJETIVOS

3.5.1. GENERAL

- Evaluar la dinámica en poblaciones simpátricas de *Polylepis* spp., en el Páramo de la Virgen, mediante marcadores moleculares SSRs e ISSRs.

3.5.2. ESPECÍFICOS

- Realizar el genotipaje de cada individuo con marcadores microsatélites.
- Determinar la diversidad génica intra e inter-poblacional de dos parches de bosque de *Polylepis* spp. muestreados mediante la evaluación de marcadores microsatélites.
- Determinar si existe flujo génico entre las especies simpátricas de *Polylepis* evaluadas mediante análisis discriminantes.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

4.1.1. SITIOS DE COLECCIÓN

Se seleccionaron dos sitios de colecta (Figura 1) a partir del estudio poblacional realizado por Troya (2006) en *Polylepis incana*. Se tomó en cuenta la cercanía, historia natural (registro de ubicación geográfica) y la altitud que favorecen el crecimiento de *P. incana* y *P. pauta*. Estos parches, codificados como SV por el nombre del investigador, se encuentran separados por carreteras y vías del oleoducto:

- **SV1:** Provincia de Pichincha, carretera Quito-Baeza, entrada por la Virgen pequeña (camino antiguo). Parche a lo largo de la carretera (Figura 2). Altura promedio 3 970 m.s.n.m (S 0° 19' 28,3" y O 78° 12' 42,3").
- **SV2:** Provincia de Napo, carretera Quito-Baeza, entrada por la Virgen. Parche a lo largo de la carretera y vía del oleoducto (Figura 3). Altura promedio 3 960 m.s.n.m (S 0° 20' 35,3" y O 78° 12' 05,2").

4.1.2. IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Mediante la clave propuesta por Romoleroux (1996) se identificaron en el campo a *Polylepis incana*, *P. pauta* e individuos con características morfológicas intermedias que se registraron como posibles híbridos. Además, con la ayuda de la clave propuesta por Schmidt–Lebuhn *et al.* (2006a) se determinó la especie de cada individuo colectado, tomando en cuenta el número de foliolos, forma del ápice y características del haz (Tabla 1). Dependiendo de cuántas características eran

compartidas se los catalogó como: *P. incana*, *P. pauta* o posibles híbridos (morfología de *P. incana* pero con mayor número de foliolos).

4.1.3. MÉTODO DE COLECCIÓN

Sobre un transecto lineal, se colectaron entre ocho y diez foliolos jóvenes de una sola rama de cada individuo identificado y seleccionado al azar; se registró su ubicación aproximada utilizando un geoposicionador (GPS). Se colocaron los foliolos en bolsas herméticas (previamente marcadas) que contenían el secante sílica gel, para eliminar el agua del tejido foliar, preservando su ADN. Todas las muestras colectadas se encuentran catalogadas y preservadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

4.2. EXTRACCIÓN DE ADN

Se tomó como base el protocolo definido por Troya (2006), sobre el cual se hicieron varias modificaciones.

4.2.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN

Se pesaron 25mg de muestra foliar, se maceró en un tubo eppendorf de 2ml con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1ml de buffer de extracción bromuro de cetiltrimetilamonio 4X (CTAB) (Anexo 1) precalentado a 65° C y 5µl de β-mercaptoetanol; se mezcló con un vórtex hasta tener un macerado homogéneo y se incubó por una hora (1h) en el termobloque a 65° C. Se centrifugaron las muestras a 10 000 rpm por 10 minutos y se colocó el sobrenadante en un nuevo tubo eppendorf de 2ml. Se realizaron tres lavados; el primero con 1ml de cloroformo-isoamil (24:1), el segundo con un volumen de fenol-cloroformo-isoamil (25:24:1) y el tercero,

nuevamente, con un volumen de cloroformo-isoamil (24:1). Entre cada lavado se agitó la muestra durante 10 minutos, y se centrifugó por 10 minutos a 10 000 rpm; se recuperó la fase líquida superior, y se la transfirió a un nuevo tubo eppendorf para proceder con el siguiente lavado. Posteriormente, para precipitar el ADN, se colocó $\frac{2}{3}$ del volumen de isopropanol frío y se dejó a -20° C durante toda la noche. Después de este paso, se centrifugó a 10 000 rpm por 10 minutos para la formación de un pellet y se retiró el isopropanol. Se lavó el pellet con 1ml de etanol 70% por 15 minutos; se retiró el etanol y se dejó secar el pellet durante 30–45 minutos en el termobloque a 37° C. Se colocó 50 μ l de buffer TE (Anexo 1) para resuspender el ADN y se añadió 1 μ l de RNAsa A (10mg/ml) para eliminar el exceso de ARN, se incubó a 37° C durante 45 minutos.

4.2.2. CUANTIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE CALIDAD DE ADN

Se cuantificó el ADN de cada muestra mediante espectrofotometría utilizando el Thermo Scientific NanoDrop™ 1 000 de amplio espectro (220–750 nm) (Tabla 2). Esta técnica también permite determinar la calidad de ADN extraído; así, una relación entre los valores de absorbancia 260/280 mayor o igual a 1,8 es aceptado como puro; valores menores a este pueden indicar la presencia de fenoles u otros contaminantes (Thermo Fisher Scientific, 2008). Mientras que, la relación de los valores de absorbancia a 280 y 230 nm determina el tipo de contaminación encontrado, este puede ser por proteínas ($280 > 230$), buffer ($280 < 230$) o que no presenta contaminación ($280 = 230$) (Henning, 2011).

Se visualizó la calidad de ADN mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% (Anexo 1), para lo cual se tomó 5 μ l de muestra y se le adicionó 3 μ l de

buffer de carga para agarosa y SYBR gold 5% (9:1) (Anexo 1). La electroforesis se realizó en la cámara Sunrise 96 de Gibco, bajo condiciones estándares (buffer de corrida TBE 1X), a 80 voltios constantes durante 1 hora. Se visualizaron las bandas en el transiluminador de luz azul (Safe ImagerTM, Invitrogen); donde el SYBR gold, adherido al ADN, se excita y emite fluorescencia, haciéndolo visible.

Se almacenaron las soluciones stock a -20°C, en alícuotas de 10ng/μl de cada muestra. Se utilizaron estas soluciones para las amplificaciones de microsatélites e ISSR's.

4.3. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

4.3.1. INICIADORES UTILIZADOS

Las amplificaciones de PCR se realizaron con cinco iniciadores diseñados para *Fragaria*. Este tipo de amplificación se la conoce como amplificación cruzada y es posible ya que ambas especies pertenecen a la misma subfamilia Potentilloideae, Rosaceae. Una lista detallada de las características de cada iniciador utilizado se la encuentra en la Tabla 3.

4.3.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25μl con las siguientes condiciones: Buffer PCR 1X, 1,5mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 0,2mM de cada iniciador (sentido y anti-sentido), 0,5U/μl de Taq polimerasa (Promega ®) y 10ng/μl de ADN.

4.3.3. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

El programa de amplificación consistió en una fase de denaturación inicial a 92° C por 2 minutos, seguida de 10 ciclos de 30 segundos de denaturación a 92° C, 45 segundos de anillamiento a la temperatura (Ta) correspondiente al iniciador (Tabla 3) y 1 minuto de extensión a 72° C; luego de los cuales hay 25 ciclos similares a los anteriores pero la temperatura de anillamiento aumenta en 2° C a la correspondiente al iniciador. Concluidos los ciclos, se realizó una fase de extensión final a 72° C por 5 minutos y finalmente las muestras se las llevó a 4° C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador MyCycler™ BioRad.

4.3.4. VERIFICACIÓN DE LOS AMPLIFICADOS

Se verificó la amplificación de cada muestra mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3% (Anexo 1) a 100 voltios constantes durante 1 hora. Se tomó 5µl del producto de PCR y se le adicionó 3µl de buffer de carga para agarosa y SYBR gold 5% (9:1) (Anexo 1). Dependiendo de la intensidad de las bandas observadas, se clasificaron los productos como altos, medios y bajos. Además, se utilizó 2µl de la escalera TrackIt™ 100bp (Invitrogen) en 3µl de buffer de carga como referencia para estimar el peso molecular de los amplificados. Se comparó la distancia de migración de las bandas con los fragmentos de ADN de la escalera con pesos ya establecidos que van desde 100 a 1 500 pb, separados cada 100 pb, y una banda adicional a 2 072 pb.

4.4. VISUALIZACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS

Los polimorfismos fueron visualizados en geles denaturantes de acrilamida al 6% urea 7M, los cuales se prepararon a partir de una solución stock al 30% de acrilamida-

bisacriamida (19:1) (Anexo 1). La electroforesis se realizó en cámaras verticales Sequi-Gen ®, Biorad.

El gel fue revelado mediante la técnica de tinción plata método Carbonato; el nitrato de plata se une al ADN y se reduce formando un depósito de plata metálico en presencia del formaldehído y de un pH alcalino (Joseph, 1998).

4.4.1. ARMADO DE LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS

Para el armado de la cámara vertical Sequi-Gen ® (Biorad) se trató al vidrio repelente con 500µl de solución repelente comercial y al vidrio atrayente con 1,5ml de la solución atractiva (Anexo 1). Se utilizaron separadores de 0,4mm y peines del mismo grosor (de 48 posillos) para formar el gel, se llenó el espacio entre los vidrios con 75ml de acrilamida 6% urea 7M.

4.4.2. CONDICIONES DE MIGRACIÓN

Una vez armada la cámara, se utilizó como buffer de corrida TBE 1X y una fuente de poder PowerPac 3 000Xi de BioRad. Se pre-corrió por 30 minutos a voltaje constante (40W) para calentar el gel (40–45° C). Al concluir este tiempo, se retiró el peine para formar los pocillos y se los limpió de los restos de urea y acrilamida.

La migración de los fragmentos de ADN es inversamente proporcional a su peso molecular, es decir, los fragmentos de menor tamaño migran mayor distancia mientras que los de mayor tamaño migran menor distancia.

4.4.3. PREPARACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

Tomando en cuenta la clasificación de los productos de PCR, por intensidad de bandas observada en la verificación de la amplificación en geles de agarosa, se agregó un volumen definido de buffer de carga para acrilamida (Anexo 1). Así, a los productos con alta intensidad se les colocó $\frac{3}{4}$ del volumen total del amplificado, a los productos de mediana intensidad $\frac{1}{2}$ del volumen total y a los de baja intensidad $\frac{1}{4}$ del volumen total. Como marcador de referencia de peso molecular, se usó la escalera para AFLP's 30–330 pb de InvitrogenTM (Anexo 1) la cual presenta bandas con 10pb de separación. Se denaturaron los productos y la escalera a 94° C por 5 minutos y se los mantuvo en hielo mientras se cargaron 1,5µl de cada producto en los pocillos del gel de acrilamida.

El tiempo de corrida varió entre 1–1,5 horas a voltaje constante (40W), dependiendo del peso de los fragmentos producidos por la amplificación.

4.4.4. TINCIÓN PLATA

Al terminar la corrida del gel se procedió a desarmar la cámara. Se colocó el vidrio atractivo en la solución fijadora por 20 minutos (Anexo 1); cada paso de la tinción se realizó con agitación horizontal y se eliminó el exceso de líquido del gel entre cada proceso. Se retiró el gel de la solución y se hizo tres lavados con agua MilliQ de 2 minutos cada uno. Se sumergió el gel por 45 minutos en la solución de coloración, nitrato de plata 1% (Anexo 1), y se lo cubrió para evitar el paso de luz. Enseguida se retiró el gel de la solución y se lo lavó por 10 segundos con agua MilliQ. Se colocó el gel en la solución reveladora, carbonato de sodio (Anexo 1), hasta el apareamiento de las bandas, esta solución debe estar entre 4–10° C. Se colocó el gel en la solución paradora por 3 minutos (Anexo 1); ésta solución detiene el proceso de

revelado, evitando que el gel se torne completamente negro. Finalmente, se lavó el gel con agua MilliQ por 3 minutos y se dejó secar.

4.5. AMPLIFICACIÓN DE ISSR's

4.5.1. INICIADORES UTILIZADOS

En una variación del análisis de segregantes agrupados (BSA; por sus siglas en inglés), se agruparon las muestras en 32 grupos, dependiendo de su distribución geográfica. Se amplificó cada grupo con los iniciadores 844-A y 17898-B seleccionados a partir del estudio poblacional de Ochoa *et al.* (2008) en *Polylepis*; estos iniciadores fueron escogidos por su poder de resolución y por producir igual número de bandas en las dos localidades analizadas. Se seleccionó el grupo que presentaba la mayor variación (mayor número de bandas) para amplificar los individuos por separado (Tabla 4).

Cada iniciador está conformado por repeticiones de dinucleótidos y dos bases diferentes en su extremo 3', esto permite que su sitio de unión sea más específica y reproducible.

4.5.2. CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25µl con las siguientes condiciones: Buffer PCR 1X, 2mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP's, 1uM de iniciador, 1U/µl de Taq polimerasa (Promega ®) y 10ng/µl de ADN.

4.5.3. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN

El programa de amplificación consistió en una fase de denaturación a 94° C por 2 minutos, seguida de 40 ciclos; cada ciclo comprendió 30 segundos de denaturación a 94° C, 45 segundos de anillamiento a la temperatura correspondiente al iniciador (Tabla 5) y 2 minutos de extensión a 72° C. Concluidos los ciclos, se realizó una fase de extensión final a 72° C por 7 minutos y finalmente las muestras se las llevó a 4° C. Las amplificaciones se llevaron a cabo en el termociclador MyCycler™ BioRad.

4.5.4. VISUALIZACIÓN DE POLIMORFISMOS

Se visualizaron los polimorfismos mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2,5% (Anexo 1) a 90 voltios constantes durante cinco horas. Se tomó 5µl del producto de PCR y se le adicionó 3µl de buffer de carga para agarosa y SYBR gold 5% (9:1) (Anexo 1). Se utilizó como referencia 2µl de la escalera TrackIt™ 100bp (Invitrogen), en 3µl de buffer de carga, permitiendo así determinar el peso molecular de los amplificados.

Transcurridas las cinco horas, se fotografió el gel con los amplificados. El tamaño de los fragmentos se determinó a partir de los tamaños estándares de la escalera TrackIt™ 100bp (Invitrogen) de acuerdo con el algoritmo proporcionado por el software GelAnalyzer (Derechos Reservados 2010 por Dr. István Lázár). Los tamaños de los fragmentos fueron utilizados para asignar loci a cada iniciador. Se construyó una matriz binaria de presencia/ausencia (1/0) para registrar los diferentes patrones de bandas (fingerprinting) de los individuos muestreados.

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizaron diferentes análisis estadísticos según la naturaleza del marcador (dominante o codominante) utilizado. Para el análisis co-dominante se obtuvo una estimación de heterocigosidad y se analizó la distancia de disimilaridad genética de Lynch (1990), aconsejada para estudios con individuos poliploides (Clark y Jasienniuk, 2011; Kosman y Leonard, 2005). Mientras que para el análisis dominante, la heterocigosidad fue analizada mediante la diversidad de Nei (1973), a partir de las frecuencias alélicas (Yeh *et al.*, 1997); las distancias genéticas fueron obtenidas por la distancia de Nei (1972).

4.6.1. MICROSATÉLITES

El análisis de datos codominantes en individuos poliploides es limitado por el reto de identificar verdaderos genotipos para heterocigotos parciales. Además, en especies alotetraploides, es difícil asignar alelos a sus respectivos locus homólogos ya que el patrón de herencia es muy complejo (van Puyvelde *et al.*, 2010; Clark y Jasienniuk, 2011).

Para este tipo de análisis existen programas que: proporcionan una estimación repetitiva de frecuencias de los alelos para los datos con ambigüedad de número de copia de alelos (POLYSAT, Clark y Jasienniuk, 2011); examinan un subconjunto aleatorio de todas las combinaciones posibles del genotipo a través de simulaciones de Monte Carlo (ATETRA, van Puyvelde *et al.*, 2010); y, mediante un enfoque de agrupación Bayesiano, identifican subpoblaciones actuales y asignan los individuos a las mismas (STRUCTURE, Pritchard *et al.*, 2000).

4.6.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

4.6.1.1.1. FRECUENCIAS ALÉLICAS

Al ser un sistema de poliploidía mixto la función *simpleFreq*, del programa POLYSAT versión 1.2–1 (Clark y Jasienniuk, 2011), calcula las frecuencias alélicas de la matriz de pesos. Esta función asume que en un genotipo parcialmente heterocigoto, todos los alelos tienen igual oportunidad de estar presentes en más de una copia (Clark y Jasienniuk, 2011).

4.6.1.1.2. HETEROCIGOSIDAD

- Heterocigosidad Esperada (H_E , 1987): es la proporción de heterocigotos esperados bajo reproducción al azar, así:

$$H_E = \left(1 - \sum_{i=1}^s p_i^2 \right)$$

donde p_i es la frecuencia del alelo i en la población en un locus determinado y s es el número de genotipos (van Puyvelde *et al.*, 2010).

- Heterocigosidad Observada (H_o): estima la proporción de heterocigotos observados en un locus determinado, así:

$$H_o = \frac{\# \text{ individuos heterocigotos}}{\# \text{ total de individuos}}$$

4.6.1.1.3. ESTIMACIÓN DE POLIPLOIDÍA

La función *estimatePloidy*, del programa POLYSAT versión 1.2–1 (Clark y Jasienniuk, 2011), calcula el número máximo de alelos y la media para

cada muestra a través de un conjunto dado de loci. Los genotipos faltantes no se toman en cuenta.

4.6.1.1.4. *EVENNESS*

Es un indicador de qué tan equitativamente están divididos los genotipos sobre la población (van Puyvelde *et al.*, 2010). Un valor de 1 indica que los genotipos tienen frecuencias iguales, así:

$$even = \frac{1}{s} \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$$

donde s es el número de genotipos. Se obtuvo este índice mediante el programa ATetra (van Puyvelde *et al.*, 2010)

4.6.1.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

4.6.1.2.1. F_{ST}

Los estadísticos F son índices que caracterizan la estructura genética de poblaciones. A partir de la estimación de frecuencias alélicas, el F_{ST} (índice de fijación) evalúa la probabilidad de que los alelos sean idénticos por descendencia desde una población ancestral (Wright, 1951). El tamaño de la población se mide por el número de genomas, más no por el número de individuos.

POLYSAT versión 1.2-1 (Clark y Jasienniuk, 2011) utiliza la función *calcFst* para obtener este índice a partir de las frecuencias alélicas, así:

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

donde H_S es la heterocigosidad de cada población combinadas y H_T la heterocigosidad esperada para la población.

Valores de $F_{ST} < 0,05$ indican panmixia; un F_{ST} de 0,05 a 0,15 poca diferenciación; de 0,15 a 0,25 diferenciación moderada; de 0,25 a 0,99 gran diferenciación entre subpoblaciones; y un F_{ST} de 1 indica endogamia (Peakall y Smouse, 2006).

4.6.1.2.2. PORCENTAJE DE PERTENENCIA POBLACIONAL

STRUCTURE, versión 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000), permite estimar el número de poblaciones (K) existentes en un grupo de estudio. Para determinar K , se relaciona el menor valor de la probabilidad de los datos ($\ln P(D)$) y la estabilidad de α después de varias corridas. Además, α determina el grado de “admixture” de las poblaciones. Un valor $\alpha < 1$ implica que la mayoría de individuos pertenecen a una u otra población, mientras que un $\alpha > 1$ implica que la mayoría de los individuos se mezclan (Pritchard *et al.*, 2000).

Por otra parte, para determinar la ascendencia de los individuos se implementó un modelo de “admixture”. Este modelo analiza si los individuos presentan ancestros mixtos, es decir que el individuo i ha heredado una fracción de su genoma a partir de ancestros de la población k . La estimación de la media

posterior de estas proporciones corresponde al *Porcentaje de Pertenencia* de cada individuo a su población geográfica (Pritchard *et al.*, 2000).

4.6.1.2.3. ANÁLISIS DE VARIANCA MOLECULAR (AMOVA)

Es un método para estudiar la diferenciación en poblaciones directamente de datos moleculares. Al ser un ANOVA (análisis de varianza) anidado, permite la división jerárquica de la variación genética entre poblaciones y dentro de poblaciones. Así, se puede probar la hipótesis nula: las subpoblaciones son parte de una población genética grande con reproducción al azar (no hay diferenciación entre las poblaciones) (Peakall y Smouse, 2006).

Se utilizó el programa GenAlEx, versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006), para estudiar la diferenciación obtenida a partir de la matriz de distancias.

4.6.1.3. DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES

4.6.1.3.1. DISTANCIA DE LYNCH (1990)

Define una medida de similaridad (S) entre patrones de bandas de ADN. Se la calcula duplicando el número de bandas (n) que dos individuos (x, y) tienen en común, a este valor se lo divide para el número total de bandas que los dos genotipos tienen; así:

$$S_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y}$$

POLYSAT (Clark y Jasienniuk, 2011) emplea la función *Lynch.distance* que genera una matriz de distancias de disimilaridad ($S_{xy} - 1$) lo que ayuda al análisis de individuos poliploides.

4.6.1.3.2. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA)

Es una técnica de escalamiento multidimensional métrico que permite encontrar y trazar los patrones más importantes dentro de un conjunto de datos multivariados (Peakall y Smouse, 2006). Produce un gráfico de pocas dimensiones, que abarca la mayor cantidad posible de la variación total, en donde las distancias entre los puntos son lo más cercanas a la matriz original (Jolliffe, 2002).

A partir de la matriz de distancias genéticas se calcularon los *auto-vectores* y *auto-valores* para cada individuo mediante el software NTSYS versión 2.0 (Rohlf, 1998). El *auto-vector* (eigen-vector) es el que, después de haber sido multiplicado por la matriz sigue siendo paralelo al vector original. Mientras que, el *auto-valor* (eigen-value) es el factor por el cual el vector se potencia cuando se multiplica por la matriz; estos valores son clasificados de mayor a menor. Cada eje del PCoA tiene un *auto-valor* asociado, este valor se relaciona con la cantidad de variación que se explica por el eje (Jolliffe, 2002). Cada eje sucesivo explica proporcionalmente menos de la variación total, de tal manera que cuando hay grupos distintos, los primeros 2 ó 3 ejes revelarán la mayor parte de la separación entre los grupos (Peakall y Smouse, 2006).

4.6.2. ISSR's

En especies poliploides no se puede establecer una fácil interpretación de las relaciones alélicas analizadas con marcadores dominantes. La probabilidad de que más de dos alelos pueden residir en un determinado locus o que un producto de PCR polimórfico de igual peso molecular pueda representar dos o más alelos divergentes en

sus secuencias (van Dam, 2002) son algunos de los inconvenientes que esta técnica presenta.

Es por esto que un análisis de desequilibrio ligado debe ser el primer paso para el estudio de individuos poliploides mediante marcadores dominantes (van Dam, 2002). El programa POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997) permite estimar desequilibrio gamético entre pares de loci y pruebas de significación chi-cuadrado (χ^2) para poblaciones individuales.

Al descartar desequilibrio ligado entre los loci encontrados es posible analizar los datos obtenidos como cualquier matriz binaria, independientemente del nivel de poliploidía que presentan los individuos.

4.6.2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

4.6.2.1.1. *FRECUENCIAS ALÉLICAS*

Se calculó las frecuencias alélicas de cada locus a partir de la matriz binaria mediante los programas GenAlEx versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006) y POPGENE versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997).

Además, a partir de las frecuencias alélicas, se calcula el número de alelos diferentes (N_a) y el número efectivo de alelos (N_e) (Yeh *et al.*, 1997; Peakall y Smouse, 2006).

4.6.2.1.2. PORCENTAJE DE LOCI POLIMÓRFICOS

La matriz binaria de los ISSR's permite calcular el porcentaje de loci polimórficos en las poblaciones (PLP) así:

$$PLP = \frac{\# \text{ loci polimórficos}}{\# \text{ loci totales}} \times 100\%$$

Este porcentaje es independiente de las frecuencias alélicas (Yeh *et al.*, 1997).

4.6.2.1.3. DIVERSIDAD DE NEI (1973)

Nei (1973) propone un análisis de diversidad genética (H) en poblaciones subdivididas, en el que la identidad genética (J) es una medida de variación de una población. Se obtiene la diversidad media dentro de subpoblaciones (H_S) a partir del promedio de identidad genética dentro de las mismas (J_S), así:

$$H_S = 1 - J_S$$

Mientras que, la diversidad genética de la población total (H_T) se basa en la relación entre H_S y la diversidad promedio entre las subpoblaciones, incluyendo la comparación de las subpoblaciones con ellos mismo (D_{ST}); así: $H_T = H_S + D_{ST}$. De esta forma se puede analizar la diversidad genética dentro y entre subpoblaciones.

4.6.2.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

4.6.2.2.1. G_{ST}

POPGENE, versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997), permite evaluar la variación genética entre poblaciones a partir del coeficiente G_{ST} , una extensión del F_{ST}

para casos de alelos múltiples (Nei, 1973). Se lo calcula a partir de la diversidad genética de la población total (H_T) y la diversidad media dentro de las subpoblaciones (H_S), así:

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

A partir de este valor, se puede calcular el flujo génico (Nm) así:

$$Nm = 0,5 (1 - G_{ST})$$

4.6.2.2.2. ANÁLISIS DE VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA)

Se utilizó el programa GenAlEx, versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006), para estudiar la diferenciación obtenida mediante la amplificación de los ISSR's y su matriz de distancias.

4.6.2.3. DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES

4.6.2.3.1. DISTANCIA GENÉTICA DE NEI (1972)

Es un coeficiente de disimilaridad que se basa en mutación y deriva génica; estima el promedio de sustituciones de codones por locus (Nei, 1972).

A partir de la Identidad de Nei (I), donde J_{xy} es la suma de frecuencias de cada alelo en las poblaciones X e Y; se calcula la distancia (D). Estos valores varían entre 0 (individuos similares) al infinito.

$$Nei I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{(J_x J_y)}}$$

$$Nei D = -\ln (I)$$

Se calculó la distancia e identidad de Nei (1972) GenAlEx versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006) y POPGENE, versión 1.31 (Yeh *et al.*, 1997).

4.6.2.3.2. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA)

A partir de la matriz de distancias genéticas, GenAlEx versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006) permitió graficar las pautas más importantes dentro del conjunto de datos multivariantes.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS

En las localidades muestreadas se encontraron y colectaron individuos de *Polylepis incana* y *P. pauta*, identificados mediante las claves propuestas por Romoleroux (1996) y Schmidt–Lebuhn *et al.* (2006a), además de individuos con características morfológicas intermedias registrados como posibles híbridos. De acuerdo a las claves, ninguno de los individuos correspondieron a *P. sericea*.

La fragmentación del páramo de la Virgen dificulta un muestreo homogéneo. En la localidad SV1 se encontraron individuos tanto de *P. incana*, *P. pauta* así como posibles híbridos, dando un total de 22 individuos muestreados: 42% posibles híbridos, 38% *P. incana* y 19% *P. pauta*; porcentajes según la identificación taxonómica morfológica. En la localidad SV2 solo se encontraron individuos de *P. pauta* y posibles híbridos morfológicos, se colectaron 137 individuos (56% posibles híbridos y 44% *P. pauta*); no se encontraron individuos con características morfológicas de *P. incana* (hojas trifoliadas). Como referencia, se incluyeron en la muestra cuatro individuos de *P. incana*, identificados y utilizados en los estudios de Lizarzaburu (2002) (Figura 1), dando un total de 163 individuos analizados (Tabla 1).

Tomando en cuenta estas variables, se aplicaron los diferentes análisis estadísticos a nivel de especies y localidades.

5.2. EXTRACCIÓN DE ADN

El uso de fenol-cloroformo y la adición de un ciclo de lavado con cloroformo-isoamil, al protocolo de extracción propuesto por Troya (2006), disminuyeron la concentración de sales y compuestos secundarios y aumentaron la cantidad de ADN obtenido (Figura 4). Sin embargo, estas soluciones limitan la pureza del ADN extraído.

De los 163 individuos, 64 muestras presentaron ADN de buena calidad, con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,8 (Tabla 2). Sin embargo, todas las muestras presentaron algún tipo de contaminación; la mayoría (161 muestras) estuvieron contaminadas por el buffer y dos estuvieron contaminadas con proteínas. No obstante, se obtuvieron amplificaciones adecuadas para todas las muestras.

5.3. AMPLIFICACIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA MEDIANTE MICROSATÉLITES

Los iniciadores diseñados para *Fragaria* fueron exitosos al amplificar los individuos de *Polylepsis* colectados; sin embargo, el peso molecular de los productos de esta amplificación es diferente a los reportados en *Fragaria* (Tabla 3).

Los geles de poliacrilamida al 6% urea 7M permitieron visualizar las bandas de interés para cada locus analizado (Figura 5); se observó poca variabilidad entre las bandas. A partir de estos datos se obtuvo una matriz de los alelos para cada individuo. Se observaron 17 alelos como resultado de la amplificación de cinco loci (Tabla 6). Los individuos *P. incana* presentaron 11 alelos, mientras que los individuos *P. pauta* y los posibles híbridos presentaron 17 alelos cada uno; además, las localidades presentaron 16 alelos cada una.

5.4. AMPLIFICACIÓN DE ISSR's

A partir de la amplificación y visualización de los diferentes grupos, se seleccionaron los seis más variables para amplificarlos individualmente. Se adicionaron dos individuos (SV2-15 y SV2-79) más variables, según la amplificación de microsatélites, dando un total de 33 individuos amplificados (Figura 6, Tabla 4) mediante los iniciadores 844-A y 17898-B. Algunos individuos no amplificaron, por lo que los análisis estadísticos se basan en 29 individuos y un total de 78 loci.

5.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

5.5.1. MICROSATÉLITES

5.5.1.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

A partir de las frecuencias alélicas (Tabla 6), se analizó el índice F_{ST} arrojando valores menores a 0,05 para localidades (F_{ST} : 0,003) y especies (Tabla 7).

Se estimó la heterocigosidad esperada (H_E) y la observada (H_O) para las especies, *P. incana* (H_E : 0,310; H_O : 0,400), *P. pauta* (H_E : 0,381; H_O : 0,534) y los posibles híbridos (H_E : 0,366; H_O : 0,534); y para las localidades, SV1 (H_E : 0,402; H_O : 0,508) y SV2 (H_E : 0,377; H_O : 0,453) (Tabla 8). En todos los casos se puede observar un exceso de heterocigosidad observada comparada con el valor esperado.

Al determinar que tan equitativamente están divididos los genotipos en cada especie, el índice de Evenness (even) arroja valores menores a 1 tanto para

especies (*P. incana*: 0,170; *P. pauta*: 0,027 e Híbridos: 0,020) como para localidades (SV1: 0,073 y SV2: 0,013) (Tabla 8).

La relación entre el número máximo de alelos y la media de los mismos permite definir un nivel aproximado de poliploidía para cada individuo (Tabla 9). El 53% de los individuos son triploides, mientras que un 36% son diploides. Porcentajes mucho menores ocupan la tetraploidía (7%) y la haploidía (3%). Estos niveles son independientes de la localidad o especie a la que los individuos pertenecen.

5.5.1.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Siguiendo el modelo “admixture”, STRUCTURE estableció dos poblaciones genéticas (A y B). Según los porcentajes de pertenencia, se catalogó a un individuo como perteneciente a una población a partir de un margen del 90% (Tabla 10). Los individuos con porcentajes menores al establecido se los clasificaron como posibles migrantes (C).

El 54,54% de individuos de *P. incana* se encuentran catalogados dentro de la población A y el 18,18% dentro de B. Tanto los individuos de *P. pauta* como los híbridos se encuentran distribuidos equitativamente en ambas poblaciones (*P. pauta*: 45,56% en A y 44,303% en B; Híbridos 45,55% en A y 36,65% en B). Esto demuestra que los grupos encontrados por STRUCTURE no presentan concordancia con la clasificación morfológica *a priori*.

La mayoría de individuos de la localidad SV1 (75,9%) se los clasifica en la población A; mientras que, el 85,5% de individuos de SV2 se los relaciona con la población B.

Al analizar la variación (AMOVA) presente entre las diferentes especies, se encontró que la mayor variación está dentro de las poblaciones (99%); con una proporción de la variación entre las poblaciones (ϕ_{PT}) de 0,017^{NS} (intervalo de confianza al 95%) (Tabla 11).

5.5.1.3. DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES

A partir de la matriz de distancias de Lynch se realizó un análisis multivariado (PCoA). Éste explica un 90,9% de la variación total en los tres primeros ejes; el primer eje explica un 38,4% de la variación y el segundo eje un 29,0%, no se visualiza una separación clara entre los individuos de las diferentes especies (Figura 7).

5.5.2. ISSR's

La probabilidad de que los loci encontrados estén en desequilibrio ligado es del 2% para ambas localidades.

5.5.2.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVOS Y DIVERSIDAD GENÉTICA

Mediante la amplificación de los dos iniciadores de ISSR's (844-A y 17898-B) se obtuvieron 78 loci (bandas) en 29 individuos; con una heterocigosidad media de 0,244 (Tabla 12). De estos, 73 loci son polimórficos, dando un porcentaje de polimorfismo del 93,6%.

Los individuos de *P. pauta* y los híbridos presentaron gran número de bandas polimórficas (*P. pauta*: 74 bandas con 94,9% de polimorfismo; Híbridos: 62 bandas con un 79,5%) (Tabla 13). Además, se determinó la presencia de bandas únicas y su heterocigosidad media (H_M) (*P. pauta*: 10 bandas únicas con una H_M : 0,268; Híbridos: 3 bandas únicas con una H_M : 0,238). Los individuos de *P. incana* presentaron menor porcentaje de bandas polimórficas (33 bandas, 42,3%) y una H_M : 0,150; no se determinaron bandas únicas.

Al comparar las dos localidades, SV2 presenta mayor número de bandas polimórficas (71 bandas; 91,0%) que la localidad SV1 (56 bandas; 71,8%) (Tabla 13). Además, SV2 tiene más bandas únicas (22) que SV1 (7) y una H_M mayor (0,258 y 0,230 respectivamente).

La diversidad genética de Nei (1973) calculada para las especies permite estimar el nivel de variación genética en las poblaciones (Tabla 14). A partir de los valores de diversidad de las especies de H_T (0,248) y H_S (0,218) se puede inferir D_{ST} ($D_{ST} = H_T - H_S$) permitiendo determinar que la diversidad genética es mayor dentro de las poblaciones de especies (H_S) que entre las mismas (D_{ST} : 0,03).

Esta estimación de la diversidad, calculada para el total de los individuos agrupados por localidades (H_T : 0,257) permite inferir que la variación se da dentro de las mismas (H_S : 0,244) y no entre ellas (D_{ST} : 0,013).

5.5.2.2. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

A partir de los valores de H_T y H_S se obtuvo un coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) de 0,120 para las especies y de 0,052 para las localidades. Además un valor de flujo génico (N_m) de 3,7 para las especies y 9,2 para las localidades.

El resultado del AMOVA demuestra que la variación presente en las especies se encuentra dentro de los mismos (95%); con una proporción de la variación entre las poblaciones (ϕ_{PT}) de 0,048^{NS} (intervalo de confianza al 95%) (Tabla 15).

La mayor identidad genética de Nei (1972) se la encuentra entre *P. pauta* e híbridos IG: 0,964 (DG: 0,036). La relación con *P. incana* es menos marcada; así su identidad genética con *P. pauta* y los híbridos es de 0,933 (DG: 0,070). Mientras que, las localidades SV1 y SV2 presentan una IG: 0,966 (DG: 0,035).

5.5.2.3. DISTANCIAS INTER-POBLACIONALES

A partir de la matriz de distancias de Nei (1972) se realizó un análisis multivariado (PCoA). Éste explica un 60% de la variación total en los tres primeros ejes. La Figura 8 explica un 43,3% de la variación (eje 1: 23,3% y eje 2: 20%). La distribución de los individuos analizados no presenta ningún patrón de agrupamiento.

6. DISCUSIÓN

Al parecer, las especies de *Polylepis* se han establecido a través de aislamiento ecológico y/o geográfico ya que sus barreras reproductivas son débiles (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a), por lo que eventos de hibridación entre especies simpátricas son factibles. Así, *P. incana* se encuentra en las laderas occidentales de los Andes, las cuales son más secas y con una temperatura media anual mayor que las laderas orientales, donde se encuentra *P. pauta* (Cierjacks *et al.*, 2007; Simpson, 1979).

Para determinar la relación existente entre *P. incana* y *P. pauta*, es necesario aclarar la definición de especie utilizada para este género. La aplicación de un concepto de especie biológico puede terminar en el reconocimiento de una sola especie, lo que eliminaría las diferencias morfológicas conspicuas entre muchas poblaciones y patrones biogeográficos claros (Kessler y Schmidt-Lebuhn, 2006). Estudios anteriores se basan en un concepto tipológico, el cual toma en cuenta tanto caracteres morfológicos como el grado de especialización (Kessler, 1995; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a; Simpson 1979, 1986). Sin embargo, Kessler y Schmidt-Lebuhn (2006) proponen el uso del concepto filogenético de especie en el que se toma en cuenta las diferencias morfológicas, biogeográficas y ecológicas entre poblaciones, siempre y cuando el intercambio genético con otras poblaciones no inhiba el desarrollo evolutivo independiente de las mismas. Es por esto que es necesario un estudio molecular que determine el nivel de independencia de las especies.

Además, se han realizado varios intentos por clasificar filogenéticamente a este género, la mayoría de los cuales se basan en características morfológicas y en los grupos previamente establecidos: *reticulata*, *sericea* y el complejo *incana* (Simpson 1979, 1986).

P. incana se encuentra en el complejo del mismo nombre mientras que *P. pauta* en el grupo *sericea* (Simpson 1979, 1986). Así, Kessler (1995) presenta un cladograma, basado en caracteres morfológicos, en el cual determina que el grupo *sericea* es basal y los grupos *incana* y *reticulata* son taxones hermanos. Kerr (2004), por su parte, analizó cuatro loci de nrITS y tres de *Adh1* encontrando altos niveles de polimorfismo por lo que la mayoría de especies demuestran ser polifiléticas y con diferentes topologías. Lizarzaburu (2002) utilizó PCR-RFLP de un segmento de ± 2400 pb del gen cloroplástico *trnK*, para un análisis filogenético del género, sin obtener mayores resultados debido a la baja variabilidad obtenida. Mientras que Schmidt-Lebuhn, *et al.* (2006a), utilizó tanto caracteres morfológicos como moleculares (AFLP). Sus resultados coinciden con Kessler siendo el grupo *sericea* el más basal, seguido de *reticulata* y su taxón hermano el complejo *incana*. Estos resultados demuestran que *P. incana* y *P. pauta* no se encuentran cercanamente relacionados. Asimismo, concuerda con Kerr al encontrar agrupaciones parciales de acuerdo a la proximidad geográfica, generando la ruptura del grupo *reticulata* y la irradiación de algunas especies de amplia distribución en los clados. Tal es el caso de *P. incana* y *P. sericea*, especies de amplia distribución que se agrupan, en el cladograma, con especies de la misma localidad dando como resultado varias apariciones en los árboles; esto se podría deber a posibles eventos de hibridación e introgresión.

Éstas diferencias entre las filogenias obtenidas tanto morfológica como molecularmente pueden explicarse por flujo génico; por lo que se hace difícil subdividir a este género filogenéticamente (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a) y sustenta el posible flujo génico encontrado en este estudio entre *P. incana* y *P. pauta*.

Es por esto que marcadores moleculares que abarquen todo el genoma deberían ser considerados como una alternativa adicional o viable en estudios sobre especies que presenten problemas al analizar secuencias de genes (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a). El uso de marcadores microsatélites se justifica al intentar evidenciar flujo génico entre las poblaciones simpátricas de *Polylepis*. Estos marcadores analizan la evolución neutra de los individuos, permitiendo establecer eventos de reproducción e intercambio genético que no son sujetos a ninguna fuerza de selección (Rong *et al.*, 2004; Wallace y Klein, 2004). Sin embargo, como *Polylepis* presenta una conformación cromosómica compleja, fue necesario corroborar los resultados mediante la amplificación de ISSRs. Éstos marcadores dominantes analizan regiones tanto conservadas como no-conservadas, por lo que es útil para análisis filogenéticos y puede determinar especies (González y Aguirre, 2007). Al obtener resultados similares, se puede asumir una falta de diferenciación genética entre las dos especies presentes en el lugar de estudio.

6.1. AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los microsatélites son loci abundantes en todas las especies y han demostrado estar bien conservados entre linajes próximos (Piñera *et al.*, 2006). Se han reportado varios estudios que utilizan la amplificación cruzada para genotipaje (Bassil *et al.*, 2005; Bisognin *et al.*, 2009; Dirlewanger *et al.*, 2002; Roa *et al.*, 2000), un ejemplo es la caracterización de chirimoya y especies emparentadas como *Annona* y *Rollinia* con iniciadores diseñados en *Annona cherimola* (Escribano *et al.*, 2004), lo que comprueba la efectividad de la técnica.

Tomando en cuenta que *Polylepis* no es un género muy estudiado y que hasta el momento no se han reportado microsatélites diseñados para el mismo, se utilizaron iniciadores de *Fragaria*; que es el género más cercano disponible dentro de la subfamilia Potentilloideae (Potter *et al.*, 2007). *Fragaria* ha sido ampliamente estudiado debido a su importancia económica, y se ha comprobado su capacidad para amplificar individuos de otros géneros dentro de la misma familia (Zorrilla-Fontana *et al.*, 2011). El costo relacionado al diseño y síntesis de iniciadores de microsatélites especie específicos limita la posibilidad de que ésta sea una tecnología que se pueda implementar con facilidad, de ahí la ventaja de usar la técnica de amplificación cruzada desde especies de interés comercial hacia sus especies silvestres relacionadas filogenéticamente (Portero, 2004).

La amplificación cruzada con los cinco iniciadores (Figura 5) fue exitosa. La variación encontrada en el peso molecular de los productos de la amplificación puede deberse a inserciones o deleciones propias de eventos de especiación (Bassil *et al.*, 2005). Se podría confirmar si los productos obtenidos presentan homología a través de técnicas de extracción de bandas y el secuenciamiento de las mismas.

6.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

Estudios de genética poblacional utilizando marcadores dominantes (ISSR's y AFLP's) han encontrado porcentajes de polimorfismo entre 78% a 90% (Culley *et al.*, 2007; Ochoa, *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2006; Troya, 2006), lo que determina que los marcadores son bastante informativos. Particularmente, en éste estudio, se encontró un 93,6% de polimorfismo en ISSR's y un 80% en microsatélites.

Polylepis es un género poliploide cuyo número cromosómico aún no se ha determinado con exactitud y es variable entre poblaciones de la misma especie (Kerr, 2004; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010), por lo tanto es difícil definir si el número de alelos visualizados en cada locus representa el máximo nivel de poliploidía para un individuo (Escribano *et al.*, 2004).

Entre los individuos analizados, a partir de la amplificación de microsatélites, se estimaron varios niveles de poliploidía siendo los más frecuentes los triploides y diploides (53% y 37% de individuos respectivamente). No obstante, estos valores no se relacionan con la especie a la que se les cataloga (*P. pauta* y *P. incana*). Esto apoya la idea de que dentro de la misma especie puede haber diferentes números cromosómicos, convirtiéndose en una característica propia de cada población (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010).

Por otro lado, los valores de heterocigosidad esperada (H_E) demuestran que los individuos *P. pauta* son más diversos, seguido de los posibles híbridos (Tabla 8); por lo tanto, los individuos de *P. incana* son alrededor del 15% al 19% menos diversos. Además, la heterocigosidad media entre las especies resalta la diversidad genética existente en *P. pauta*; acentuando la diferencia de diversidad *P. incana* es de 37% a 44% menos diversa. Estos resultados concuerdan con estudios anteriores que señalan que *P. pauta* es un 10% más diverso que *P. incana* (Ochoa *et al.*, 2008; Troya, 2006).

Hensen, *et al.*, (2011) atribuyen la poca diversidad encontrada en *P. incana* a una correlación negativa con la altitud. Ésta puede deberse a que la cantidad de semillas decrece conforme aumenta la altitud. Cierjacks, *et al.* (2007), atribuye este fenómeno a una menor floración y al aumento de mortalidad de semillas como consecuencia de condiciones climáticas extremas. Así, la altura promedio en las localidades muestreadas es

de 3 960 m.s.n.m., este valor es muy cercano al límite superior para la especie por lo que su diversidad puede disminuir. Troya (2006) encuentra una correlación similar entre las poblaciones cercanas a los límites altitudinales (3 500 y 3 900 m.s.n.m.), presentando un rango de heterocigosidad media de 0,051 a 0,160 y un rango de diversidad de Nei de 0,062 a 0,1848.

En comparación con la heterocigosidad esperada, los valores de heterocigosidad observada (H_O) son ligeramente mayores tanto para las especies como para las localidades (Tabla 8), esto puede sugerir que la reproducción no es al azar. Se ha demostrado que en especies poliploides existe un incremento en el número de heterocigotos (Soltis y Soltis, 2000) lo que permitiría explicar esta ligera diferencia entre H_O y H_E . Sin embargo, es importante mencionar, que al utilizar la metodología de amplificación cruzada, no se puede asegurar que se estén muestreando todos los alelos, esto podría interferir en los valores de heterocigosidad obtenidos, ya que los alelos presentes pueden ser sobreestimados (Bassil *et al.*, 2005).

6.3. ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

En base al programa STRUCTURE es posible agrupar los individuos de estudio en dos poblaciones genéticas (A y B). Éstos grupos indican la poca diferenciación existente entre *P. pauta* y *P. incana* y sus posibles híbridos descartando su función como estructura genética; ya que las especies se encuentran distribuidas en ambas poblaciones. Este agrupamiento, posiblemente, se relaciona con las localidades; el 76% de individuos de SV1 pertenecen a la población A, mientras que el 86% de individuos de SV2 pertenecen a la población B. Este agrupamiento geográfico concuerda con lo obtenido por Schmidt-

Lebuhn, *et al.* (2006a) a partir de AFLP, quien atribuye estos resultados al flujo génico entre distintas especies.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos del AMOVA, se puede determinar que la mayor variación presente en los individuos de estudio se la encuentra dentro de las poblaciones (diversidad de Nei: 88%; AMOVA: entre 95% a 99%). Estos resultados están acorde con lo definido en otros estudios que describen que especies arbóreas se caracterizan por poseer elevados niveles de variación genética dentro de las poblaciones y niveles bajos entre poblaciones (Kwak *et al.*, 1998). La poca diferenciación entre especies es corroborada por el índice de fijación (F_{ST}) y el coeficiente G_{ST} , pues presentaron valores entre 0,002 y 0,120. Valores menores a 0,15 indican panmixia (Peakall y Smouse, 2006). Estos resultados proporcionan evidencia adicional a lo propuesto sobre eventos de hibridación y poca separación entre especies (Kerr, 2004; Romoleroux, 1996; Troya, 2006).

Es importante mencionar, que las distancias genéticas entre individuos es reducida, la distancia de Nei revela menor diferencia entre los individuos de *P. pauta* con los posibles híbridos (DG: 0,036), y una mayor diferenciación de *P. incana* con individuos *P. pauta* e híbridos (DG: 0,070). Debido a que los individuos aloploidos pueden perder parte de su genoma al reorganizar sus juegos cromosómicos, generalmente el paterno (Liu *et al.*, 2009), se puede inferir que los híbridos eliminaron parte del genoma de *P. incana* y mantuvieron el posible genoma materno (*P. pauta*). Al graficar las distancias genéticas mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) se evidencia la falta de agrupamiento, este patrón puede deberse a un estado de panmixia entre las especies. La

variación existente en las poblaciones se explica en un 43% para los ISSRs (Figura 8) y un 67% para los SSRs (Figura 7).

La falta de estructura génica entre *P. pauta* y *P. incana* puede deberse al flujo génico (Nm: 3,651) (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006b) ya sea por polinización anemófila o acción antropogénica (Hensen *et al.*, 2011; Renison *et al.*, 2006) por reforestaciones no planificadas o con especies diferentes a las naturales. Además, las barreras de las especies son porosas para la mayoría del genoma de *Polylepis* (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2010) por lo que es posible que se den eventos de hibridación y/o introgresión reduciendo la diferencia genética entre las dos especies y homogenizando el pool genético (Troya, 2006). Esto podría solventar la hipótesis de Kerr (2004) sobre la presencia de un “complejo de especies” dentro de *Polylepis*.

Asimismo, la fragmentación del bosque por procesos antropogénicos (quema, tala, apertura de carreteras, etc.) puede ser la causa de la reducción del hábitat y del tamaño de la población. No obstante, la poca variación entre poblaciones y una distancia genética reducida descartan los efectos de la fragmentación sobre la separación de estas localidades (Culley *et al.*, 2007; Young *et al.*, 1996).

Esta poca diferenciación entre las dos localidades (SV1 y SV2) puede indicar una reciente separación de un mismo bosque de *Polylepis*; ya que la divergencia entre poblaciones está directamente relacionada con el tiempo (Schaal *et al.*, 1998). Tomando en cuenta el mismo patrón para las especies (poca diferenciación entre poblaciones), se puede inferir que no se ha logrado una delimitación estricta entre las especies, haciendo que la dinámica en las especies de *Polylepis* sea compleja.

Estas dos localidades se encuentran a 2,4 Km. de distancia, y no hay elevaciones de mayor importancia (la mayor es de 4 100 m.s.n.m., teniendo un promedio de 3 900 m.s.n.m. en cada localidad), por lo que la probabilidad de que el polen viaje de una a otra manteniendo un alto flujo génico y disminuyendo la diferenciación es alta; se ha reportado que en *P. australis* éste puede viajar hasta 80 Km. (Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006a). Troya (2006), en un estudio de las poblaciones de *P. incana* en Papallacta usando AFLPs, también encontró esta relación entre dos localidades con una separación de 2,8 Km. de distancia que presentaban poca diferenciación (DG: 0,05; F_{ST} : 0,205 y un Nm: 1,954).

P. incana y *P. pauta* presentan flujo génico y una poca variación genética entre ellas lo que hace difícil agrupar a sus individuos ya sea por especies o localidades. Sin embargo, esta poca variación entre poblaciones permite desarrollar planes de reforestación utilizando individuos de la misma especie con diversidad genética alta (Aragundi *et al.*, 2011); tomando en cuenta la conformación de especies propia del sitio. Esto se puede dar ya que cada especie presenta gran variación dentro de la misma y aumentar la variación existente no afectará la estructura genética establecida.

La poca variabilidad en las bandas observadas y la pérdida de parte del genoma al reorganizar sus juegos cromosómicos, propia de individuos aloploiploides (Liu *et al.*, 2009), dificultan la determinación de introgresión entre las especies estudiadas, sin embargo, la presencia de híbridos se la puede inferir a través de los análisis estadísticos.

7. CONCLUSIONES

- Mediante marcadores moleculares microsatélites e ISSR's se confirmó la baja diferenciación genética y un flujo genético homogenizador entre *P. incana* y *P. pauta*, en el páramo de la Virgen.
- Se realizó amplificación cruzada mediante iniciadores de microsatélites diseñados para *Fragaria*. Sin embargo, el análisis es complejo debido al nivel de poliploidía indefinido y variable para cada especie. Se visualizó entre dos a cuatro alelos a la vez por locus en determinados individuos.
- Se podría inferir el nivel de poliploidía de una especie al analizar varios loci hasta encontrar el número máximo de alelos, tomando en cuenta que los individuos analizados son heterocigotos. Los homocigotos enmascaran el número de alelos presentes por locus.
- Se encontró mayor diversidad de *P. pauta* con relación a *P. incana*. Esto puede deberse al rango altitudinal donde se encontraban estos individuos. Se afirmó la relación inversa entre la altitud y la diversidad genética encontrado para *P. incana*.
- Se encontró poca variación entre poblaciones lo que puede indicar reciente separación de un mismo bosque y señala que la fragmentación, por procesos antropogénicos, en el páramo de la Virgen no influye en la composición genética de la población.

- La distancia de dispersión de polen, para este género, es amplia por lo que facilita el flujo génico entre parches. Esta capacidad de mantener flujo génico y las pocas barreras reproductivas entre especies podrían llevar a una homogenización del pool; por lo que la hipótesis del “complejo de especies” se sustenta en este estudio.

8. LITERATURA CITADA

- Aragundi, S., Hamrick, J.L. y Parker K.C. 2011. **Genetic insights into the historical distribution of *Polylepis pauta* (Rosaceae) in the northeastern Cordillera Oriental of Ecuador.** Conservation Genetics 12: 607–618.
- Azócar, A., Rada, F. y García-Núñez, C. 2007. **Functional characteristics of the arborescent genus *Polylepis* along a latitudinal gradient in the high Andes.** Interciencia 32 (10): 663–668.
- Bakker, J., Moscol Olivera, M. y Hooghiemstra, H. 2008. **Holocene environmental change at the upper forest line in northern Ecuador.** The Holocene 18 (6): 877–893.
- Bassil, N.V., Botta, R., y Mehlenbacher, S.A., 2005. **Microsatellite markers in Hazelnut: Isolation, Characterization, and Cross-species Amplification.** Journal of the American Society for Horticultural Science. 130 (4): 543–549.
- Bisognin, C., Seemüller, E., Citterio, S., Velasco, R., Grando, M.S. y Jarausch, W. 2009. **Use of SSR markers to assess sexual vs. apomictic origin and ploidy level of breeding progeny derived from crosses of apple proliferation-resistant *Malus sieboldii* and its hybrids with *Malus X domestica* cultivars.** Plant Breeding 128: 507–513.

- Cierjacks, A., Wesche, K., Hensen, I. 2007. **Potential lateral expansion of *Polylepis* forest fragments in central Ecuador**. *Forest Ecology and Management* 242: 477–486
- Cierjacks, A., Rühr, N. K., Wesche, K. y Hensen, I. 2008. **Effects of altitude and livestock on the regeneration of two tree line forming *Polylepis* species in Ecuador**. *Plant Ecology* 194: 207-221.
- Clark, L.V. y Jasienniuk, M. 2011. **POLYSAT: an R package for polyploidy microsatellite analysis**. *Molecular Ecology Resources*. 11 (3): 562–566.
- Colmenares Arteaga, M. 2002. **Estudio del crecimiento de *Polylepis sericea* Wedd. en el páramo venezolano**. Tesis de Licenciatura. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela. pp. 5, 6 y 19.
- Culley, T.M., Sbita, S.J. y Wick, A. 2007. **Population Genetic Effect of Urban Habitat Fragmentation in the Perennial Herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR Markers**. *Annals of Botany* 100 (1): 91–100.
- Dirlewanger, E., Cosson, P., Tavaud, M., Arazana, J., Poizat, C., Zanetto, A., Arus, P. y Laigret, F. 2002. **Development of microsatellite markers in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*Prunus avium* L.)**. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 127–138.

- Escribano, P, Viruel, M.A. y Hormaza, I. 2004. **Characterization and cross-species amplification of microsatellite markers in cherimoya (*Annona cherimola* Mill., Annonaceae)**. *Molecular Ecology Notes* 4: 746–748.
- González, A. y Aguirre, X. 2007. **Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)**. En: *Ecología Molecular* (L. Equiarte, V. Souza y X. Aguirre, comps.). pp. 567–571. Instituto Nacional de Ecología. Mexico.
- Henning, W. 2011. **Molecular Genetics Techniques and Concepts**. Institute of Genetics, Johannes Gutenberg-University. Mainz, Germany.
- Hensen, I., Cierjacks, A., Hirsch, H., Kessler, M., Romoleroux, K., Renison, D. y Wesche, K. 2011. **Historical and recent fragmentation coupled with altitude affect the genetic population structure of one of the world's highest tropical tree line species**. *Global Ecology and Biogeography*.
- IPGRI y Cornell University. 2003. **Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje: Tecnologías basadas en el ADN**. pp. 31–34.
- Jolliffe, I.T. 2002. **Principal component analysis, Second Edition**. Springer, New York.
- Jørgensen, P.M. y Ulloa Ulloa. C. 1994. **Seed plants of the high Andes of Ecuador – A checklist**. *AAU Reports*. 34: 1–443

- Joseph, S.S. 1998. **The Analysis of Microsatellites by Silver Staining of Nondenaturing Polyacrylamide Gels**. En: Nucleic Acid Electrophoresis (D. Tietz, ed.). pp. 162–169. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York.
- Jung, S., Staton, M., Lee, T., Blenda, A., Svancara, R., Abbott, A., y Main, D. 2006. **GDR (Genome Database for Rosaceae): integrated web-database for Rosaceae genomics and genetics data. *Fragaria* Assembly V3 Protocol; Microsatellite Files**. Washington State University & Clemson University.
- Kerr, M. S. 2004. **A phylogenetic and biogeographic analysis of Sanguisorbeae (Rosaceae), with emphasis on the Pleistocene radiation of the High Andean genus *Polylepis***. Tesis de Doctorado, University of Maryland, Maryland, U.S.A.
- Kessler, M. 1995. **The genus *Polylepis* (Rosaceae) in Bolivia**. *Candollea* 50:131-171
- Kessler, M. 2006. **Bosques de *Polylepis***. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. pp. 110–120
- Kessler, M. y Schmidt-Lebuhn, A. 2006. **Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae)**. *Organisms Diversity & Evolution* 6 (1): 1–10.
- Kosman, E., y Leonard, J. 2005. **Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species**. *Molecular Ecology* 14: 415–424.

- Kwak, M.M., Velterop, O. y van Andel, J. 1998. **Pollen and gene flow in fragmented habitats**. *Applied Vegetation Science* 1: 37–54
- Liu, L.G., Yan, J.P., Liu, S.J., Liu, D., You, C.P., Zhon, H., Tao, M. Y Liu, Y. 2009. **Evolutionary analysis of allotetraploid hybrids of red crucian carp x common carp, base don ISSR, AFLP molecular markers and cloning of cyclins genes**. *Chinese Science Bulletin* 54: 2849–2861.
- Lizarzaburu, J.A. 2002. **Filogenia de *Polylepis* (Rosaceae:Sanguisorbeae) en el Ecuador mediante PCR-RFLP y posición de Sanguisorbea en Rosaceae**. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Lynch, M. (1990) **The similarity index and DNA fingerprinting**. *Molecular Biology and Evolution* 7: 478-484.
- Nei, M. 1972. **Genetic Distance Between Populations**. *The American Naturalist*. 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. **Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations**. *Proceedings of the National Academy of Science* 70 (12): 3321–3323
- Ochoa, V., Segovia-Salcedo, C., Jiménez, P., y Proaño, K. 2008. **Genética Poblacional de *P. pauta* y *P. incana* en el páramo de Papallacta y los Ilinizas mediante ISSRs**. Tesis de Ingeniería, Escuela Politécnica Nacional del Ecuador. Sangolqui, Ecuador.

- Peakall, R. y Smouse P.E. 2006. **GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research.** *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.
- Picca, A., Helguera, M., Salomón, N. y Carrera, A. 2002. **Marcadores Moleculares.** En: *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal* (C. Rubinstein y L. Mroginski, eds.). pp. 61–68. V Echenique. INTA, Rivadavia. Buenos Aires, Argentina.
- Piñera, J.A., Bernardo, D., Blanco, G., Vázquez, E. y Sánchez, J.A. 2006. **Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Pagellus bogaraveo*, and cross-species amplification in *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*.** *Molecular Ecology Notes* 6: 33–35.
- PNUMA. 2004. Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Centro de Monitoreo de Conservación Mundial.
- Portero, C. 2004. **Relaciones Genéticas entre la yuca (*Manihot esculenta*, Crantz) y especies silvestres relacionadas con énfasis en (*M. leptophylla*).** Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- Potter, D., Erikson, T., Evans, R.C., Oh, S., Smedmark, J.E.E., Morgan, D.R., Kerr, M., Robertson, K.R., Arsenault, M., Dickinson, T.A., y Campbell, C.S., 2007. **Phylogeny and classification of Rosaceae.** *Plant Systematics and Evolution*. 266: 5–43

- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly P. 2000. **Inference of population structure using multilocus genotype data.** *Genetics* 155: 945–959.
- Quija-Lamina, P., Segovia-Salcedo, C., Jadán, M. y Proaño, K. 2010. **Estandarización de la metodología para el conteo cromosómico en especies del género *Polylepis* en el Ecuador.** *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 31 (1 y 2): 33–49
- Reddy, M.P., Sarla, N. y Siddiq, E.A. 2002. **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding.** *Euphytica*. 128: 9–17.
- Renison, D., Hensen, I., Suarez, R. Y Cingolani, A.M. 2006. **Cover and growth habitat of *Polylepis* woodlands and shrublands in the mountains of central Argentina: human or environmental influence?.** *Journal of Biogeography* 33: 876–887.
- Roa, A.C., Chavarriaga-Aguirre, P., Duque, M.C., Maya M.M., Bonierbale M.W., Iglesias, C. y Tohme, J. 2000. **Cross-species amplification of Cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship.** *American Journal of Botany* 87: 1647–1655
- Rohlf, F. J. 1998. **NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.0.** Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY

- Romoleroux K.. 1996. **Rosaceae**. En: Flora of Ecuador, 56 (G. Harling y L. Andersson, eds.). pp. 71–89. Council for Nordic Publications in Botany, Copenhagen, Denmark.
- Rong, J., Xia, H., Zhu, Y., Wang, Y. y Lu, B.R. 2004. **Asymmetric gene flow between traditional and hybrid rice varieties (*Oryza sativa*) indicated by nuclear simple sequence repeats and implications for germplasm conservation**. New Phytologist 163: 439 – 445
- Satya P. 2007. **Genomics and Genetic Engineering**. New India Publishing Agency. pp. 178 – 182.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rauscher, J.T. y Smith, W.A. 1998. **Phylogeographic Studies in plants: problems and prospects**. Molecular Ecology 7: 465–474.
- Schmidt–Lebuhn, A.N., Kessler, M. y Kumar, M. 2006a. **Promiscuity in the Andes: Species Relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) based on AFLP and Morphology**. Systematic Botany 31 (3): 547–559.
- Schmidt-Lebuhn, A.N., Kumar, m. y Kessler, M. 2006b. **An assessment of the genetic population structure of two species of *Polylepis* Ruiz & Pav. (Rosacea) in the Chilean Andes**. Flora 201: 317–325

- Schmidt-Lebuhn, A.N., Seltmann, P., y Kessler, M. 2007. **Consequences of the pollination system on genetic structure and patterns of species distribution in the Andean genus *Polylepis* (Rosaceae): a comparative study.** *Plant Systematics and Evolution*. 266: 91–103
- Schmidt-Lebuhn, A. N., Fuchs, J., Hertel, D., Hirsch, H., Toivonenm J. y Kessler, M. 2010. **An Andean radiation: polyploidy in the tree genus *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae).** *Plant Biology*. German Botanical Society and the royal Botanical Society of the Netherlands. pp. 1–11.
- Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H. y Thomas, M. R. 2001. **Microsatellite Markers For Grapevine: A State Of The Art.** En: *Molecular Biology & Biotechnology of the Grapevine* (K. A. Roubelakis-Angelakis, ed.). pp. 433–463. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Li, X., Tang, F. Y Chu, B. 2006. **Intersimple Sequence Repeats (ISSR) Molecular Fingerprinting Markers for Authenticating Populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo.** *Biological Pharmaceutical Bulletin* 29 (3): 420–422.
- Simpson, B. B. 1979. **A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae).** *Smithsonian Contributions to Botany* 43: 1–62.

- Simpson, B. B. 1986. **Speciation and specialization of *Polylepis* in the Andes**. En: High Altitude Tropical Biogeography (F. Vuillemier y M. Monasterio, eds.). pp. 304-316. Oxford University Press, Nueva York.
- Soltis, P. y Soltis, D.E. 2000. **The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids**. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 7051–7057
- Thermo Fisher Scientific. 2008. **NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual**. Thermo Fisher Scientific Inc. pp. 5.1–5.3.
- Troya, A. 2006. **Diversidad genética de poblaciones de *Polylepis incana* Kunth en el Centro–Norte del Ecuador mediante AFLPs: Una aproximación a su manejo y conservación**. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito-Ecuador.
- van Dam, J. 2002. **Genetic characterisation of agronomic and morphological traits and the development of DNA markers associates with total glycoalkaloid content in tubers of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.)**. Tesis de Doctorado, Wageningen University, Países Bajos.
- van Puyvelde, K., Van Geert, S., y Triest, L. 2010. **ATETRA, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: Comparison with TETRA and TETRASAT**. Molecular Ecology Resources 10: 331–334.

- Wallace, A. L. y Klein, A. S. 2004. **Determining the affinities of salt marsh fucoids using microsatellite markers: evidence of hybridization and introgression between two species of *Fucus* (Phaeophyta) in a maine estuary.** Phycological Society of America. 40: 1013–1027.
- Wright S. 1951. **The genetical structure of populations.** Annual Eugenics 15: 323–354.
- Yeh, F.C., Yang, R., Boyle T., Ye, Z-H., Mao, J.X. 1997. **POPGENE, the user friendly shareware for population genetic analysis.** Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- Young, A., Boyle T. y Brown, T. 1996. **The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants.** Trends in Ecology & Evolution 11 (10): 413–418.
- Zorrilla-Fontanesi, Y., Cabeza A., Torres A.M., Botella, M.A., Valpuesta, V., Monfort, A., Sánchez-Sevilla, J.F. y Amaya, I. 2011. **Development and bin zapping of strawberry genic-SSRs in diploide *Fragaria* and their transferability across the Rosoidea subfamily.** Molecular Breeding 27: 137–156.

9. FIGURAS

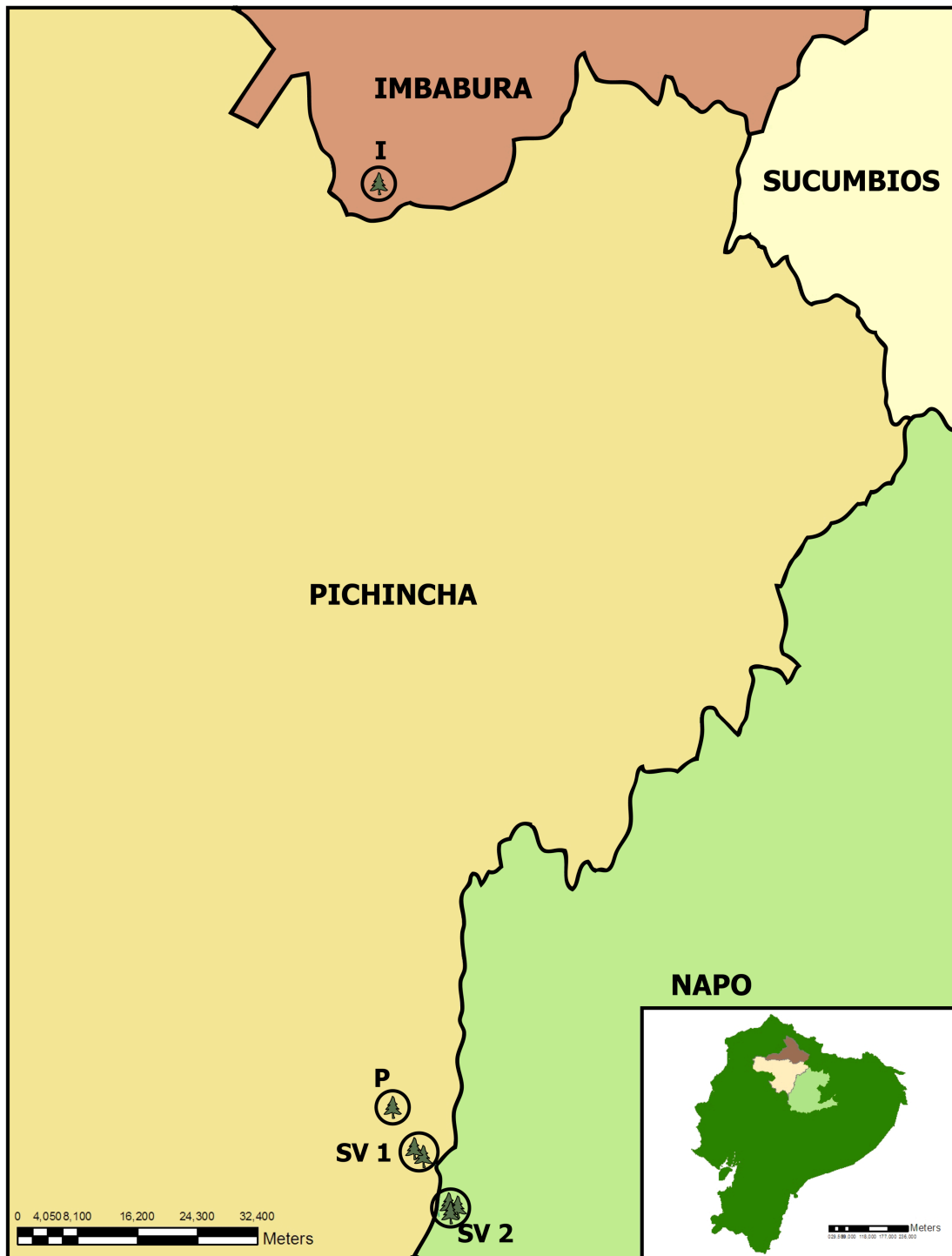


Figura 1. Sitios de colección en el páramo de la Virgen, provincia de Pichincha y Napo. La localidad SV1 se encuentra en la provincia de Pichincha, por el camino antiguo a Baeza, en la entrada a la Virgen pequeña. La localidad SV2 se encuentra en la provincia del Napo; por el camino actual a Baeza, en la entrada por la Virgen. Se ubican las muestras de *P. incana* obtenidas del estudio de Lizarzaburu (2002); P (Pichincha) se encuentra en el mismo páramo de la Virgen e I (Imbabura) colectada en la Laguna de Mojanda.



Figura 2. Localidad SV1, entrada por la Virgen pequeña (camino antiguo). Altura promedio 3 970 m.s.n.m.



Figura 3. Localidad SV2, entrada por la Virgen. Altura promedio 3 960 m.s.n.m.

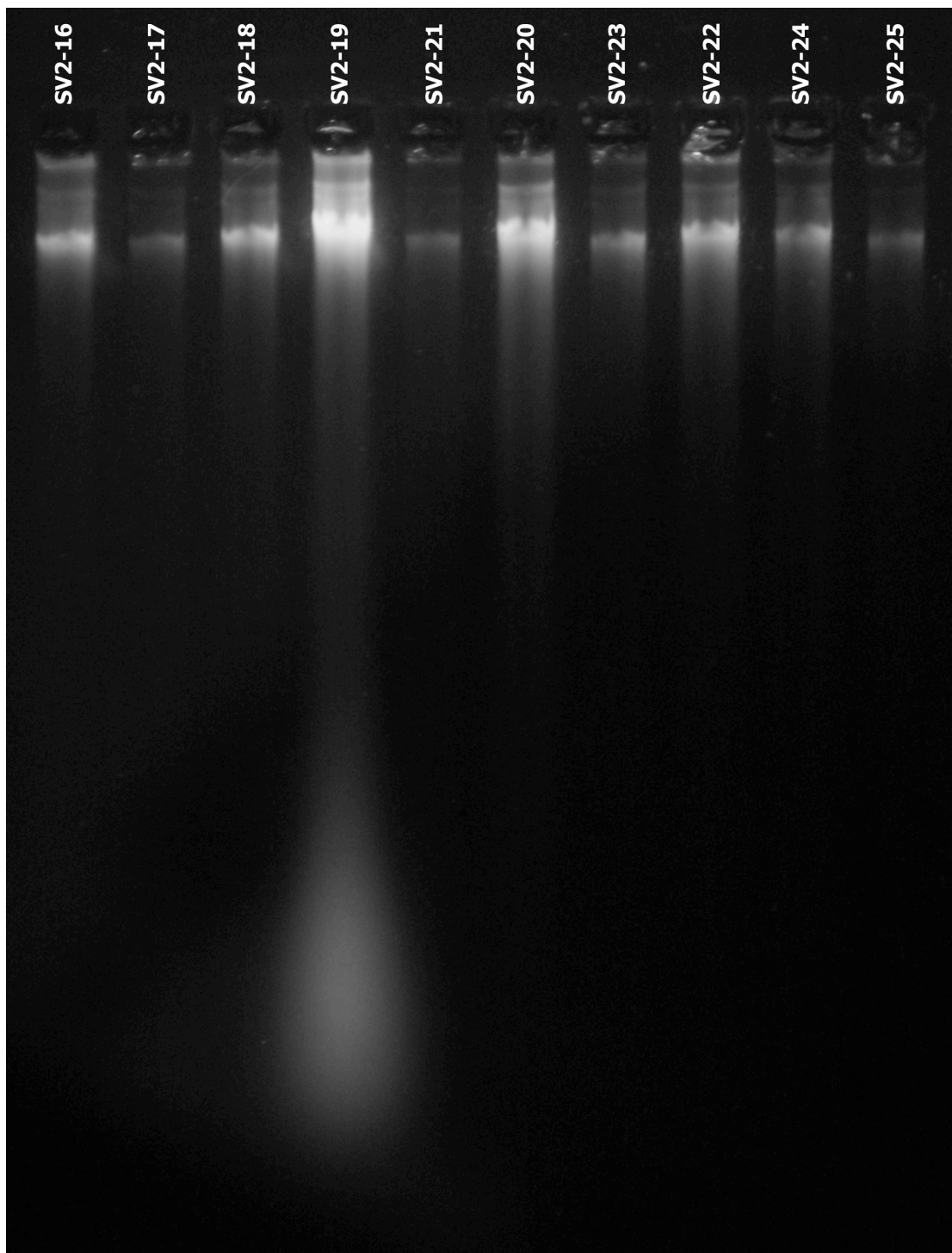


Figura 4. Verificación de extracción de ADN en un gel de agarosa al 0,8%. La muestra SV2-25 presenta menor cantidad de ADN ($182,48 \text{ ng}/\mu\text{l}$), mientras que la muestra SV2-19 presenta gran cantidad ADN ($842,67 \text{ ng}/\mu\text{l}$). También se puede observar la contaminación con buffer presente en esta muestra.

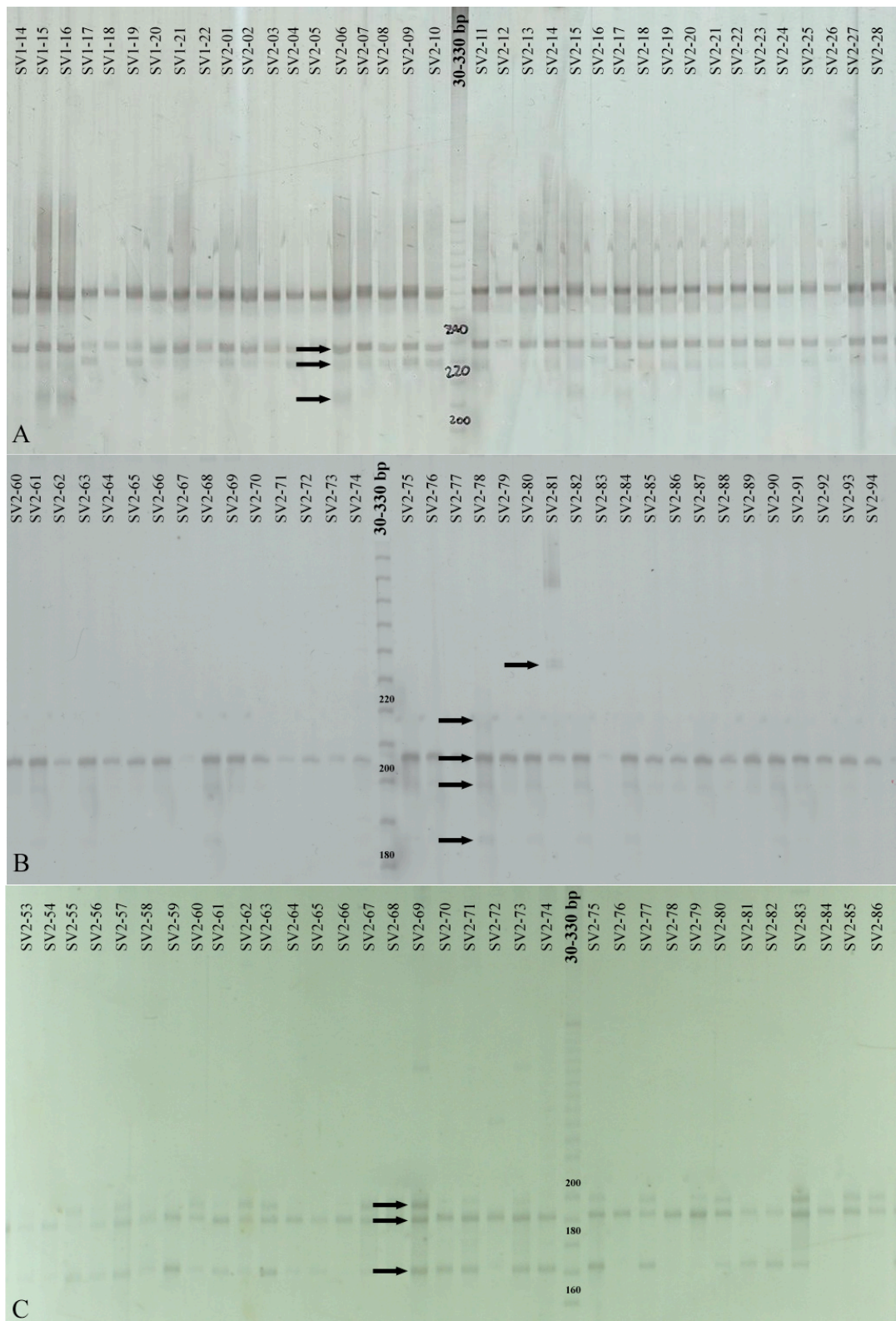


Figura 5. Visualización de polimorfismos de SSR's en geles denaturantes de acrilamida al 6% urea 7M. Las flechas señalan los alelos encontrados en A) SSR 04 (215, 230, 240 pb); B) SSR 16: 185, 200, 205, 220, 230 pb; C) SSR 17 presenta alelos con 170, 190 y 200 pb.

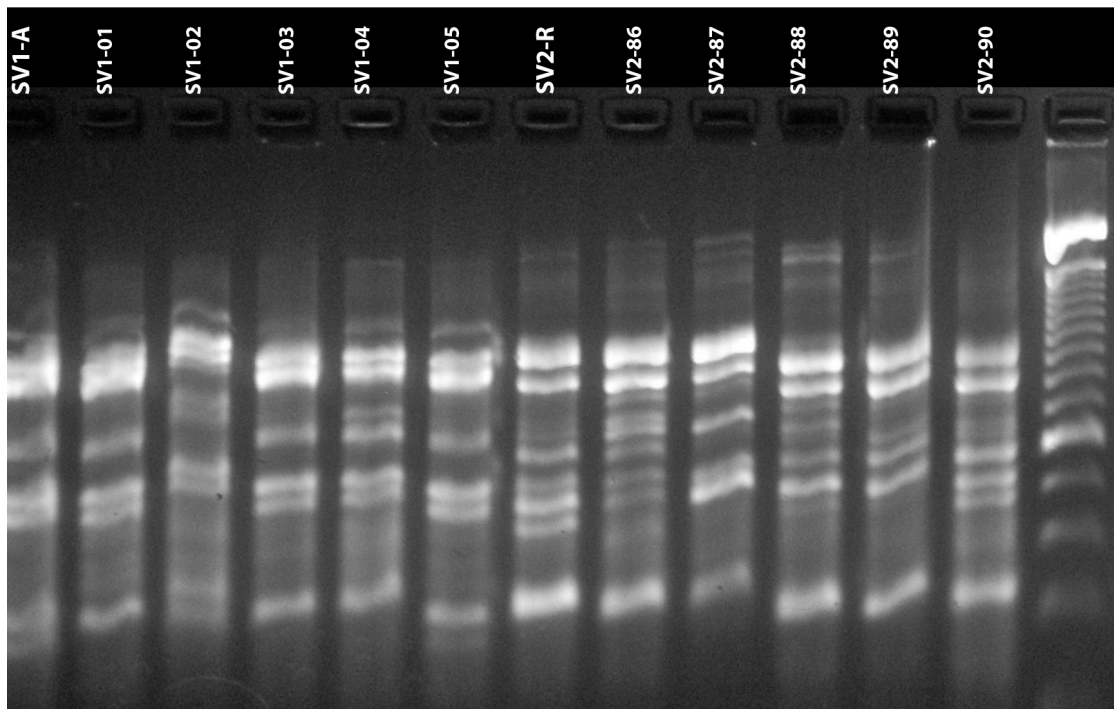


Figura 6. Verificación de la amplificación de ISSR 17898-B, gel de agarosa al 2,5%, para el grupo SV1-A y SV2-R, además de los individuos que lo conforman.

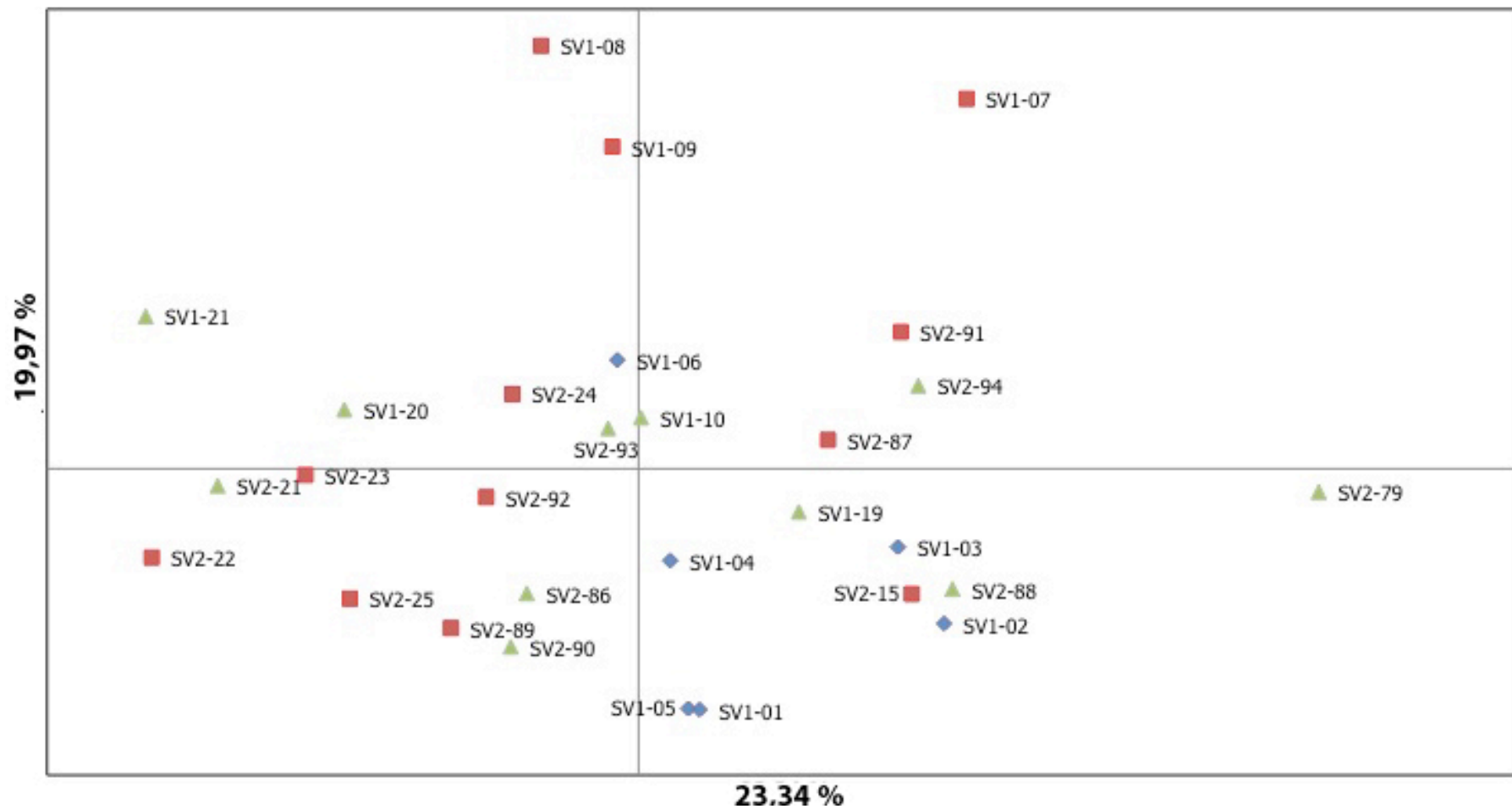


Figura 8. PCoA ISSR's a partir de matriz de distancia de Nei. Se explica un 43,31% entre los dos ejes. Se grafican individuos de *P. incana* (azul), *P. pauta* (rojo) e Híbridos (verde).

10.TABLAS

Tabla 1. Individuos, muestreados en el páramo de la Virgen, utilizados para el análisis molecular con SSRs e ISSRs. Se detalla la localidad, coordenadas geográficas (en Grados Minutos y Segundos) obtenidas mediante un GPS, altitud (m.s.n.m.), el número de foliolos (previa observación de cada individuo) y su especie, obtenido a partir de datos del número de foliolos, forma del ápice y características del haz de los foliolos comparados con la clave propuesta por Schmidt–Lebuhn *et al.* (2006b). Los individuos catalogados como “Híbrido” presentan características físicas de *P. incana* pero el número de foliolos es mayor. Además, cuatro individuos identificados y utilizados por Lizarzaburu (2002). El código representa la provincia de colecta, así P: Pichincha e I: Imbabura.

N°	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	N° de foliolos	Especie
1	SV1-01	EMMAP	0°19'19,7"	78°13'31,8"	3720	3	<i>P. incana</i>
2	SV1-02	EMMAP	0°19'19,8"	78°13'32,1"	3725	3	<i>P. incana</i>
3	SV1-03	EMMAP	0°19'20,7"	78°13'32,6"	3723	3	<i>P. incana</i>
4	SV1-04	Virgen P.	0°19'28,3"	78°12'42,3"	4032	3	<i>P. incana</i>
5	SV1-05	Virgen P.	0°19'28,3"	78°12'42,3"	4034	3	<i>P. incana</i>
6	SV1-06	Virgen P.	0°19'28,3"	78°12'42,3"	4035	3	<i>P. incana</i>
7	SV1-07	Virgen P.	0°19'28,9"	78°12'41,6"	4032	7	<i>P. pauta</i>
8	SV1-08	Virgen P.	0°19'31,2"	78°12'45,5"	4012	9	<i>P. pauta</i>
9	SV1-09	Virgen P.	0°19'31,2"	78°12'45,6"	4005	9	<i>P. pauta</i>
10	SV1-10	Virgen P.	0°19'31,2"	78°12'45,6"	4008	9	Híbrido
11	SV1-11	Virgen P.	0°19'31,3"	78°12'45,4"	4011	8	Híbrido
12	SV1-12	Virgen P.	0°19'31,3"	78°12'45,5"	3998	11	Híbrido
13	SV1-13	Virgen P.	0°19'31,3"	78°12'45,6"	4000	7	Híbrido
14	SV1-14	Virgen P.	0°19'31,4"	78°12'45,6"	3998	10	Híbrido
15	SV1-15	Virgen P.	0°19'31,4"	78°12'45,6"	4002	9	Híbrido
16	SV1-16	Virgen P.	0°19'31,4"	78°12'45,6"	4002	9	<i>P. pauta</i>
17	SV1-17	Virgen P.	0°19'31,5"	78°12'45,6"	4011	11	<i>P. pauta</i>
18	SV1-18	Virgen P.	0°19'31,6"	78°12'45,7"	4002	9	Híbrido
19	SV1-19	Virgen P.	0°19'31,7"	78°12'45,6"	4006	10	Híbrido
20	SV1-20	Virgen P.	0°19'31,8"	78°12'45,5"	3997	9	Híbrido
21	SV1-21	Virgen P.	0°19'31,8"	78°12'45,5"	3997	8	Híbrido

Tabla 1. Continuación

Nº	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	Nº de foliolos	Especie
22	SV1-22	Virgen P.	0°19'31,8"	78°12'45,5"	3997	7	Híbrido
23	SV2-01	Virgen	0°20'35,3"	78°12'05,2"	3984	11	Híbrido
24	SV2-02	Virgen	0°20'35,5"	78°12'05,0"	3983	11	<i>P. pauta</i>
25	SV2-03	Virgen	0°20'35,5"	78°12'05,0"	3985	9	Híbrido
26	SV2-04	Virgen	0°20'37,8"	78°12'05,0"	3980	11	Híbrido
27	SV2-05	Virgen	0°20'39,7"	78°12'05,6"	3970	11	Híbrido
28	SV2-06	Virgen	0°20'39,8"	78°12'05,4"	3975	10	<i>P. pauta</i>
29	SV2-07	Virgen	0°20'39,1"	78°12'05,6"	3974	9	<i>P. pauta</i>
30	SV2-08	Virgen	0°20'40,0"	78°12'05,8"	3978	10	Híbrido
31	SV2-09	Virgen	0°20'40,2"	78°12'04,2"	3964	5	Híbrido
32	SV2-10	Virgen	0°20'40,3"	78°12'04,1"	3974	10	<i>P. pauta</i>
33	SV2-11	Virgen	0°20'40,4"	78°12'06,7"	3989	11	Híbrido
34	SV2-12	Virgen	0°20'40,4"	78°12'06,7"	3990	11	<i>P. pauta</i>
35	SV2-13	Virgen	0°20'40,5"	78°12'06,6"	3987	10	<i>P. pauta</i>
36	SV2-14	Virgen	0°20'40,6"	78°12'04,2"	3964	11	<i>P. pauta</i>
37	SV2-15	Virgen	0°20'40,7"	78°12'04,0"	3967	9	<i>P. pauta</i>
38	SV2-16	Virgen	0°20'40,8"	78°12'06,4"	3984	11	Híbrido
39	SV2-17	Virgen	0°20'40,8"	78°12'06,5"	3987	9	Híbrido
40	SV2-18	Virgen	0°20'40,8"	78°12'06,6"	3990	9	Híbrido
41	SV2-19	Virgen	0°20'40,9"	78°12'06,6"	3989	9	Híbrido
42	SV2-20	Virgen	0°20'41,3"	78°12'06,5"	3990	9	<i>P. pauta</i>
43	SV2-21	Virgen	0°20'41,4"	78°12'06,3"	3984	11	Híbrido
44	SV2-22	Virgen	0°20'41,4"	78°12'06,5"	3986	11	<i>P. pauta</i>
45	SV2-23	Virgen	0°20'42,1"	78°12'06,3"	3983	11	<i>P. pauta</i>
46	SV2-24	Virgen	0°20'42,4"	78°12'06,2"	3985	13	<i>P. pauta</i>
47	SV2-25	Virgen	0°20'42,6"	78°12'03,0"	3971	13	<i>P. pauta</i>
48	SV2-26	Virgen	0°20'45,0"	78°12'04,9"	3966	11	Híbrido
49	SV2-27	Virgen	0°20'45,1"	78°12'04,2"	3974	11	<i>P. pauta</i>
50	SV2-28	Virgen	0°20'45,1"	78°12'04,3"	3976	9	<i>P. pauta</i>
51	SV2-29	Virgen	0°20'45,1"	78°12'04,7"	3967	11	Híbrido
52	SV2-30	Virgen	0°20'45,1"	78°12'04,9"	3969	11	<i>P. pauta</i>
53	SV2-31	Virgen	0°20'45,1"	78°12'04,9"	3967	11	Híbrido
54	SV2-32	Virgen	0°20'45,2"	78°12'03,8"	3970	9	<i>P. pauta</i>

Tabla 1. Continuación

Nº	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	Nº de foliolos	Especie
55	SV2-33	Virgen	0°20'45,2"	78°12'03,8"	3973	9	Híbrido
56	SV2-34	Virgen	0°20'45,2"	78°12'03,9"	3977	9	<i>P. pauta</i>
57	SV2-35	Virgen	0°20'45,2"	78°12'04,5"	3975	13	Híbrido
58	SV2-36	Virgen	0°20'45,3"	78°12'04,0"	3974	13	Híbrido
59	SV2-37	Virgen	0°20'45,4"	78°12'04,8"	3964	11	<i>P. pauta</i>
60	SV2-38	Virgen	0°20'45,5"	78°12'03,6"	3970	13	<i>P. pauta</i>
61	SV2-39	Virgen	0°20'45,6"	78°12'04,9"	3972	13	Híbrido
62	SV2-40	Virgen	0°20'45,7"	78°12'04,8"	3975	13	Híbrido
63	SV2-41	Virgen	0°20'45,7"	78°12'05,0"	3970	13	Híbrido
64	SV2-42	Virgen	0°20'46,0"	78°12'03,8"	3970	11	Híbrido
65	SV2-43	Virgen	0°20'46,1"	78°12'03,7"	3972	11	Híbrido
66	SV2-44	Virgen	0°20'46,5"	78°12'04,0"	3967	13	Híbrido
67	SV2-45	Virgen	0°20'46,6"	78°12'04,1"	3968	13	Híbrido
68	SV2-46	Virgen	0°20'46,6"	78°12'04,2"	3967	11	<i>P. pauta</i>
69	SV2-47	Virgen	0°20'46,7"	78°12'04,2"	3967	11	Híbrido
70	SV2-48	Virgen	0°20'46,8"	78°12'03,1"	3963	13	<i>P. pauta</i>
71	SV2-49	Virgen	0°20'46,8"	78°12'04,1"	3965	9	<i>P. pauta</i>
72	SV2-50	Virgen	0°20'46,8"	78°12'04,2"	3965	11	Híbrido
73	SV2-51	Virgen	0°20'47,0"	78°12'04,1"	3964	9	Híbrido
74	SV2-52	Virgen	0°20'47,0"	78°12'04,1"	3966	9	Híbrido
75	SV2-53	Virgen	0°20'47,1"	78°12'03,2"	3960	10	Híbrido
76	SV2-54	Virgen	0°20'47,1"	78°12'03,3"	3961	11	Híbrido
77	SV2-55	Virgen	0°20'47,1"	78°12'03,4"	3960	11	Híbrido
78	SV2-56	Virgen	0°20'47,1"	78°12'04,1"	3961	8	Híbrido
79	SV2-57	Virgen	0°20'47,2"	78°12'03,3"	3962	9	<i>P. pauta</i>
80	SV2-58	Virgen	0°20'47,3"	78°12'03,9"	3965	11	<i>P. pauta</i>
81	SV2-59	Virgen	0°20'47,4"	78°12'03,2"	3960	9	Híbrido
82	SV2-60	Virgen	0°20'47,5"	78°12'03,2"	3960	11	Híbrido
83	SV2-61	Virgen	0°20'47,6"	78°12'03,3"	3960	11	Híbrido
84	SV2-62	Virgen	0°20'47,6"	78°12'03,3"	3959	11	Híbrido
85	SV2-63	Virgen	0°20'48,3"	78°12'03,0"	3957	11	Híbrido
86	SV2-64	Virgen	0°20'48,4"	78°12'03,1"	3957	8	Híbrido
87	SV2-65	Virgen	0°20'48,6"	78°12'02,9"	3951	9	Híbrido

Tabla 1. Continuación

Nº	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	Nº de foliolos	Especie
88	SV2-66	Virgen	0°20'48,8"	78°12'02,8"	3953	11	Híbrido
89	SV2-67	Virgen	0°20'48,9"	78°12'01,7"	3946	11	<i>P. pauta</i>
90	SV2-68	Virgen	0°20'48,9"	78°12'01,7"	3947	10	Híbrido
91	SV2-69	Virgen	0°20'48,9"	78°12'01,7"	3948	9	Híbrido
92	SV2-70	Virgen	0°20'48,9"	78°12'01,8"	3949	11	Híbrido
93	SV2-71	Virgen	0°20'48,9"	78°12'02,8"	3953	9	Híbrido
94	SV2-72	Virgen	0°20'49,1"	78°12'01,5"	3944	9	Híbrido
95	SV2-73	Virgen	0°20'49,1"	78°12'01,6"	3943	7	Híbrido
96	SV2-74	Virgen	0°20'49,1"	78°12'01,7"	3947	7	<i>P. pauta</i>
97	SV2-75	Virgen	0°20'49,2"	78°12'01,4"	3948	10	Híbrido
98	SV2-76	Virgen	0°20'49,2"	78°12'01,5"	3945	9	<i>P. pauta</i>
99	SV2-77	Virgen	0°20'49,2"	78°12'01,5"	3940	9	Híbrido
100	SV2-78	Virgen	0°20'49,2"	78°12'01,6"	3942	9	<i>P. pauta</i>
101	SV2-79	Virgen	0°20'49,3"	78°12'01,6"	3942	9	Híbrido
102	SV2-80	Virgen	0°20'49,4"	78°12'01,4"	3942	11	Híbrido
103	SV2-81	Virgen	0°20'49,5"	78°12'01,3"	3939	11	Híbrido
104	SV2-82	Virgen	0°20'49,6"	78°12'01,3"	3940	10	Híbrido
105	SV2-83	Virgen	0°20'49,6"	78°12'01,4"	3942	11	Híbrido
106	SV2-84	Virgen	0°20'49,7"	78°12'01,0"	3937	11	<i>P. pauta</i>
107	SV2-85	Virgen	0°20'49,7"	78°12'01,1"	3937	11	Híbrido
108	SV2-86	Virgen	0°20'49,7"	78°12'01,3"	3938	8	Híbrido
109	SV2-87	Virgen	0°20'49,9"	78°12'00,8"	3939	10	<i>P. pauta</i>
110	SV2-88	Virgen	0°20'50,9"	78°12'05,2"	3949	11	Híbrido
111	SV2-89	Virgen	0°20'51,2"	78°11'57,0"	3946	10	<i>P. pauta</i>
112	SV2-90	Virgen	0°20'51,7"	78°12'05,3"	3947	9	Híbrido
113	SV2-91	Virgen	0°20'52,6"	78°12'05,6"	3939	11	<i>P. pauta</i>
114	SV2-92	Virgen	0°20'52,9"	78°12'05,6"	3943	11	<i>P. pauta</i>
115	SV2-93	Virgen	0°20'53,2"	78°12'05,7"	3943	9	Híbrido
116	SV2-94	Virgen	0°20'54,6"	78°12'06,4"	3936	10	Híbrido
117	SV2-95	Virgen	0°20'56,2"	78°12'06,7"	3933	9	<i>P. pauta</i>
118	SV2-96	Virgen	0°20'56,2"	78°12'07,0"	3931	9	Híbrido
119	SV2-97	Virgen	0°20'57,5"	78°12'05,4"	3932	11	Híbrido
120	SV2-98	Virgen	0°20'57,5"	78°12'05,9"	3934	9	<i>P. pauta</i>

Tabla 1. Continuación

Nº	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	Nº de foliolos	Especie
121	SV2-99	Virgen	0°20'55,8"	78°11'51,1"	3962	9	<i>P. pauta</i>
122	SV2-100	Virgen	0°20'55,9"	78°11'51,0"	3968	9	<i>P. pauta</i>
123	SV2-101	Virgen	0°20'56,0"	78°11'51,1"	3970	9	<i>P. pauta</i>
124	SV2-102	Virgen	0°20'56,1"	78°11'50,1"	3967	11	Híbrido
125	SV2-103	Virgen	0°20'56,2"	78°11'50,7"	3963	11	<i>P. pauta</i>
126	SV2-104	Virgen	0°20'56,2"	78°11'50,8"	3961	11	<i>P. pauta</i>
127	SV2-105	Virgen	0°20'56,2"	78°11'50,8"	3964	11	<i>P. pauta</i>
128	SV2-106	Virgen	0°20'56,3"	78°11'50,7"	3966	7	<i>P. pauta</i>
129	SV2-107	Virgen	0°20'56,4"	78°11'50,7"	3966	11	<i>P. pauta</i>
130	SV2-108	Virgen	0°20'56,6"	78°11'50,4"	3967	11	<i>P. pauta</i>
131	SV2-109	Virgen	0°20'56,9"	78°11'50,3"	3965	11	Híbrido
132	SV2-110	Virgen	0°20'56,9"	78°11'50,5"	3955	11	Híbrido
133	SV2-111	Virgen	0°20'57,0"	78°11'50,0"	3970	9	Híbrido
134	SV2-112	Virgen	0°20'57,0"	78°11'50,5"	3950	9	<i>P. pauta</i>
135	SV2-113	Virgen	0°20'57,0"	78°11'50,5"	3961	11	Híbrido
136	SV2-114	Virgen	0°20'57,1"	78°11'50,3"	3960	10	<i>P. pauta</i>
137	SV2-115	Virgen	0°20'57,1"	78°11'50,5"	3952	9	<i>P. pauta</i>
138	SV2-116	Virgen	0°20'57,1"	78°11'50,7"	3960	11	Híbrido
139	SV2-117	Virgen	0°20'57,2"	78°11'50,4"	3956	11	<i>P. pauta</i>
140	SV2-118	Virgen	0°20'57,2"	78°11'50,5"	3959	11	<i>P. pauta</i>
141	SV2-119	Virgen	0°20'57,2"	78°11'50,6"	3951	11	<i>P. pauta</i>
142	SV2-120	Virgen	0°20'57,2"	78°11'50,9"	3965	9	Híbrido
143	SV2-121	Virgen	0°20'57,4"	78°11'50,4"	3948	13	Híbrido
144	SV2-122	Virgen	0°20'57,5"	78°11'51,3"	3952	11	<i>P. pauta</i>
145	SV2-123	Virgen	0°20'57,5"	78°11'51,3"	3953	11	<i>P. pauta</i>
146	SV2-124	Virgen	0°20'57,7"	78°11'50,4"	3953	11	<i>P. pauta</i>
147	SV2-125	Virgen	0°20'57,7"	78°11'51,3"	3952	9	Híbrido
148	SV2-126	Virgen	0°20'57,7"	78°11'51,3"	3950	11	Híbrido
149	SV2-127	Virgen	0°20'57,7"	78°11'51,3"	3950	9	Híbrido
150	SV2-128	Virgen	0°20'57,7"	78°11'51,3"	3950	11	<i>P. pauta</i>
151	SV2-129	Virgen	0°20'57,8"	78°11'50,5"	3952	9	<i>P. pauta</i>
152	SV2-130	Virgen	0°20'57,9"	78°11'51,3"	3952	9	Híbrido
153	SV2-131	Virgen	0°20'57,9"	78°11'51,5"	3952	11	<i>P. pauta</i>

Tabla 1. Continuación

N°	Código	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m.s.n.m.)	N° de foliolos	Especie
154	SV2-132	Virgen	0°20'58,0"	78°11'50,6"	3951	11	Híbrido
155	SV2-133	Virgen	0°20'58,0"	78°11'51,5"	3948	9	Híbrido
156	SV2-134	Virgen	0°20'58,0"	78°11'51,6"	3952	9	<i>P. pauta</i>
157	SV2-135	Virgen	0°20'58,1"	78°11'51,4"	3948	9	<i>P. pauta</i>
158	SV2-136	Virgen	0°20'58,1"	78°11'51,6"	3948	11	<i>P. pauta</i>
159	SV2-137	Virgen	0°20'58,3"	78°11'51,6"	3951	11	Híbrido
160	I5	I-Mojanda	0°08'16,0"	78°15'19,0"	3800		<i>P. incana</i>
161	I6	I-Mojanda	0°08'15,5"	78°15'18,9"	3800		<i>P. incana</i>
162	I9	I-Mojanda	0°08'19,0"	78°15'15,8"	3750		<i>P. incana</i>
163	P2	P-Papallacta	0°17'55,0"	78°14'33,0"	3615		<i>P. incana</i>

Tabla 2. Cantidad ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$) y calidad de ADN de cada individuo utilizado para el análisis molecular con SSRs e ISSRs. Datos obtenidos a partir de mediciones con el Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. Absorbancia a 230, 260 y 280 nm y su relación de absorbancia 260/280 evalúa la pureza de ADN (proporción de $\sim 1,8$ aceptado como “puro”). Relación entre los valores de absorbancia en 280 y 230 nm determina el tipo de contaminación encontrado ya sea por proteínas ($280 > 230$), buffer ($280 < 230$) o que no presenta contaminación ($280 = 230$).

N°	Código	ADN ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
1	SV1-01	209,58	5,66	4,19	2,46	1,70	Buffer
2	SV1-02	193,83	7,46	3,88	2,90	1,34	Buffer
3	SV1-03	424,43	11,17	8,49	6,90	1,23	Buffer
4	SV1-04	173,98	7,73	3,48	2,78	1,25	Buffer
5	SV1-05	562,2	11,36	11,24	7,41	1,52	Buffer
6	SV1-06	361,61	8,13	7,23	5,19	1,39	Buffer
7	SV1-07	249,6	4,54	4,99	3,21	1,56	Buffer
8	SV1-08	235,51	6,20	4,71	2,78	1,70	Buffer
9	SV1-09	520,61	8,98	10,41	5,29	1,97	Buffer
10	SV1-10	1970,16	36,15	39,40	23,14	1,70	Buffer
11	SV1-11	683,28	10,35	13,67	6,88	1,99	Buffer
12	SV1-12	444,73	7,00	8,90	4,79	1,86	Buffer
13	SV1-13	210,22	0,04	0,05	0,05	1,08	Proteínas
14	SV1-14	431,75	12,51	8,64	6,15	1,40	Buffer
15	SV1-15	583,43	9,19	11,67	5,88	1,98	Buffer
16	SV1-16	425,56	7,34	8,51	4,65	1,83	Buffer
17	SV1-17	772,19	23,76	15,44	11,55	1,34	Buffer
18	SV1-18	175,09	5,23	3,50	2,12	1,65	Buffer
19	SV1-19	392,99	11,23	7,86	5,56	1,41	Buffer

Tabla 2. Continuación

N°	Código	ADN ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
20	SV1-20	542,67	8,68	10,85	5,88	1,85	Buffer
21	SV1-21	510,81	8,96	10,22	5,60	1,82	Buffer
22	SV1-22	154,36	5,61	3,09	1,96	1,57	Buffer
23	SV2-01	320,02	6,67	6,40	3,58	1,79	Buffer
24	SV2-02	163,41	6,81	3,27	2,22	1,47	Buffer
25	SV2-03	428,19	7,14	8,56	4,63	1,85	Buffer
26	SV2-04	369,47	8,12	7,39	4,27	1,73	Buffer
27	SV2-05	331,41	7,45	6,63	3,73	1,77	Buffer
28	SV2-06	126,52	2,66	2,53	1,46	1,73	Buffer
29	SV2-07	304,65	7,62	6,09	3,56	1,71	Buffer
30	SV2-08	348,08	8,19	6,96	3,97	1,75	Buffer
31	SV2-09	332,61	6,86	6,65	3,70	1,80	Buffer
32	SV2-10	326,27	7,41	6,53	3,69	1,77	Buffer
33	SV2-11	418,11	7,60	8,36	4,55	1,84	Buffer
34	SV2-12	395,49	7,83	7,91	4,36	1,81	Buffer
35	SV2-13	761,25	13,36	15,23	7,82	1,95	Buffer
36	SV2-14	290,39	5,14	5,81	3,90	1,49	Buffer
37	SV2-15	217,3	3,22	4,35	2,35	1,85	Buffer
38	SV2-16	483,65	8,34	9,67	5,24	1,85	Buffer
39	SV2-17	407,28	7,76	8,15	4,48	1,82	Buffer
40	SV2-18	322,72	7,25	6,45	3,68	1,76	Buffer
41	SV2-19	842,67	12,86	16,85	8,57	1,97	Buffer
42	SV2-20	802,48	13,05	16,05	8,24	1,95	Buffer
43	SV2-21	444,76	7,67	8,90	4,79	1,86	Buffer
44	SV2-22	337,97	7,11	6,76	3,78	1,79	Buffer

Tabla 2. Continuación

N°	Código	ADN ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
45	SV2-23	254,9	6,71	5,10	2,98	1,71	Buffer
46	SV2-24	290,97	6,06	5,82	3,24	1,80	Buffer
47	SV2-25	182,48	6,89	3,65	2,29	1,59	Buffer
48	SV2-26	436,9	7,16	8,74	4,83	1,81	Buffer
49	SV2-27	396,37	8,91	7,93	4,58	1,73	Buffer
50	SV2-28	734,22	12,14	14,68	7,43	1,98	Buffer
51	SV2-29	351,8	6,12	7,04	3,80	1,85	Buffer
52	SV2-30	623,51	9,10	12,47	6,41	1,95	Buffer
53	SV2-31	286,43	6,16	5,73	3,20	1,79	Buffer
54	SV2-32	223,99	4,39	4,48	3,18	1,41	Buffer
55	SV2-33	191,6	3,04	3,83	2,09	1,84	Buffer
56	SV2-34	617,06	12,47	12,34	6,53	1,89	Buffer
57	SV2-35	291,84	10,24	5,84	2,02	2,89	Buffer
58	SV2-36	149,85	5,08	3,00	1,82	1,64	Buffer
59	SV2-37	442,64	7,77	8,85	4,84	1,83	Buffer
60	SV2-38	395,23	4,65	7,91	5,00	1,58	Proteínas
61	SV2-39	617,55	11,54	12,35	6,36	1,94	Buffer
62	SV2-40	561,27	8,91	11,23	6,13	1,83	Buffer
63	SV2-41	379,47	7,03	7,59	4,20	1,81	Buffer
64	SV2-42	256,7	6,26	5,13	3,06	1,68	Buffer
65	SV2-43	376	7,52	7,52	4,23	1,78	Buffer
66	SV2-44	87,71	4,87	1,75	1,26	1,39	Buffer
67	SV2-45	224,31	5,34	4,49	2,54	1,76	Buffer
68	SV2-46	505,14	8,56	10,10	5,48	1,84	Buffer
69	SV2-47	106,52	5,46	2,13	1,53	1,40	Buffer

Tabla 2. Continuación

N°	Código	ADN (ng/μl)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
70	SV2-48	679,8	11,43	13,60	7,14	1,90	Buffer
71	SV2-49	163,28	1,51	3,27	1,44	2,26	Buffer
72	SV2-50	384,39	8,09	7,69	4,43	1,73	Buffer
73	SV2-51	441,62	8,57	8,83	4,78	1,85	Buffer
74	SV2-52	775,43	10,20	15,51	7,95	1,95	Buffer
75	SV2-53	482,97	7,32	9,66	5,14	1,88	Buffer
76	SV2-54	183,98	5,49	3,68	2,20	1,67	Buffer
77	SV2-55	463,74	11,17	9,28	5,36	1,73	Buffer
78	SV2-56	580,34	9,00	11,61	6,08	1,91	Buffer
79	SV2-57	306,33	5,95	6,13	3,50	1,75	Buffer
80	SV2-58	251,12	5,84	5,02	2,86	1,75	Buffer
81	SV2-59	383,59	7,24	7,67	4,25	1,80	Buffer
82	SV2-60	706,7	11,49	14,13	7,38	1,92	Buffer
83	SV2-61	183,36	3,30	3,67	2,50	1,47	Buffer
84	SV2-62	553,39	9,62	11,07	5,90	1,88	Buffer
85	SV2-63	263,62	7,43	5,27	3,20	1,65	Buffer
86	SV2-64	297,49	7,26	5,95	3,51	1,69	Buffer
87	SV2-65	142,18	6,18	2,84	1,94	1,46	Buffer
88	SV2-66	272,79	7,91	5,46	3,33	1,64	Buffer
89	SV2-67	51,39	4,67	1,03	0,98	1,05	Buffer
90	SV2-68	124,62	3,08	2,49	1,41	1,77	Buffer
91	SV2-69	233,47	4,28	4,67	3,29	1,42	Buffer
92	SV2-70	266,07	5,98	5,32	3,05	1,74	Buffer
93	SV2-71	109,08	5,74	2,18	1,61	1,35	Buffer
94	SV2-72	388,65	7,13	7,77	4,33	1,79	Buffer

Tabla 2. Continuación

N°	Código	ADN ($\eta\text{g}/\mu\text{l}$)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
95	SV2-73	580,15	9,36	11,60	6,38	1,82	Buffer
96	SV2-74	149,48	3,11	2,99	1,71	1,75	Buffer
97	SV2-75	232,41	6,28	4,65	2,71	1,72	Buffer
98	SV2-76	380,27	7,61	7,61	4,24	1,79	Buffer
99	SV2-77	325,48	N/A	6,51	4,87	1,34	Buffer
100	SV2-78	280,98	6,11	5,62	3,08	1,83	Buffer
101	SV2-79	303,69	3,59	6,07	3,18	1,91	Buffer
102	SV2-80	320,79	6,23	6,42	3,52	1,82	Buffer
103	SV2-81	595,24	10,00	11,91	6,58	1,81	Buffer
104	SV2-82	463,63	7,99	9,27	5,02	1,85	Buffer
105	SV2-83	92,8	3,04	1,86	1,86	1,00	Buffer
106	SV2-84	958,57	13,31	19,17	9,94	1,93	Buffer
107	SV2-85	621,81	9,21	12,44	6,34	1,96	Buffer
108	SV2-86	805,3	11,03	16,11	8,14	1,98	Buffer
109	SV2-87	414,48	8,91	8,29	4,66	1,78	Buffer
110	SV2-88	247,23	7,17	4,95	3,05	1,62	Buffer
111	SV2-89	987,12	13,25	19,74	10,12	1,95	Buffer
112	SV2-90	126,09	6,15	2,52	1,77	1,42	Buffer
113	SV2-91	360,17	8,38	7,20	4,17	1,73	Buffer
114	SV2-92	163,75	5,75	3,28	2,09	1,57	Buffer
115	SV2-93	97,53	4,43	1,95	1,34	1,45	Buffer
116	SV2-94	119,95	5,22	2,40	1,62	1,48	Buffer
117	SV2-95	164,99	5,89	3,30	2,12	1,56	Buffer
118	SV2-96	483,16	9,20	9,66	5,40	1,79	Buffer
119	SV2-97	375,61	8,44	7,51	4,34	1,73	Buffer

Tabla 2. Continuación

Nº	Código	ADN (ng/μl)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
120	SV2-98	243,95	6,68	4,88	2,94	1,66	Buffer
121	SV2-99	505,84	8,43	10,12	5,49	1,84	Buffer
122	SV2-100	508,2	8,40	10,16	5,52	1,84	Buffer
123	SV2-101	239,35	5,91	4,79	2,72	1,76	Buffer
124	SV2-102	136,38	4,79	2,73	1,76	1,55	Buffer
125	SV2-103	686,06	11,07	13,72	7,29	1,88	Buffer
126	SV2-104	491,57	8,33	9,83	5,36	1,83	Buffer
127	SV2-105	990,32	14,67	19,81	10,41	1,90	Buffer
128	SV2-106	487,8	7,62	9,76	5,22	1,87	Buffer
129	SV2-107	388,05	6,87	7,76	4,22	1,84	Buffer
130	SV2-108	167,12	5,22	3,34	2,06	1,62	Buffer
131	SV2-109	121,07	5,76	2,42	1,69	1,43	Buffer
132	SV2-110	568,6	8,82	11,37	6,17	1,84	Buffer
133	SV2-111	807,85	13,03	16,16	8,81	1,83	Buffer
134	SV2-112	250,13	7,36	5,00	3,06	1,64	Buffer
135	SV2-113	305,93	6,80	6,12	3,53	1,73	Buffer
136	SV2-114	310,33	7,86	6,21	3,73	1,66	Buffer
137	SV2-115	377,01	7,62	7,54	4,29	1,76	Buffer
138	SV2-116	170,39	5,98	3,41	2,20	1,55	Buffer
139	SV2-117	273,37	6,36	5,47	3,16	1,73	Buffer
140	SV2-118	565,94	8,51	11,32	6,06	1,87	Buffer
141	SV2-119	279,02	6,98	5,58	3,27	1,71	Buffer
142	SV2-120	1173,19	15,96	23,46	12,41	1,89	Buffer
143	SV2-121	103,77	2,21	2,08	1,15	1,80	Buffer
144	SV2-122	141,7	7,27	2,83	2,02	1,40	Buffer

Tabla 2. Continuación

Nº	Código	ADN (ng/μl)	A 230	A 260	A 280	260/280	280– 230
145	SV2-123	126,59	6,49	2,53	1,83	1,38	Buffer
146	SV2-124	339,08	7,71	6,78	3,90	1,74	Buffer
147	SV2-125	120,16	4,81	2,40	1,59	1,51	Buffer
148	SV2-126	249,48	6,65	4,99	2,98	1,68	Buffer
149	SV2-127	164,84	6,22	3,30	2,14	1,54	Buffer
150	SV2-128	120,52	4,73	2,41	1,56	1,54	Buffer
151	SV2-129	99,4	5,10	1,99	1,42	1,40	Buffer
152	SV2-130	134,48	4,80	2,69	1,71	1,57	Buffer
153	SV2-131	103,95	5,78	2,08	1,52	1,37	Buffer
154	SV2-132	516,08	10,02	10,32	5,83	1,77	Buffer
155	SV2-133	104,07	5,34	2,08	1,50	1,39	Buffer
156	SV2-134	371,91	7,67	7,44	4,24	1,75	Buffer
157	SV2-135	321,4	7,74	6,43	3,76	1,71	Buffer
158	SV2-136	131,1	5,24	2,62	1,75	1,50	Buffer
159	SV2-137	511	8,38	10,22	5,54	1,84	Buffer
160	I5	218,05	5,97	4,36	2,65	1,65	Buffer
161	I6	358,8	7,55	7,18	4,16	1,72	Buffer
162	P2	420,04	8,00	8,40	4,73	1,78	Buffer
163	I9	258,56	6,72	5,17	3,08	1,68	Buffer

Tabla 3. Características de los iniciadores, diseñados en *Fragaria*, utilizados para la amplificación de microsatélites en especies de *Polylepis* (Jung, *et al.*, 2006). Se detalla el nombre del iniciador (In.), su código y descripción a partir de que especie fue obtenido, su motivo de repetición (MR), secuencia para el iniciador sentido y anti-sentido, la temperatura de anillamiento (Ta) en ° C y el peso molecular (PM) del producto de amplificación, en pares de bases (pb), obtenido en *Fragaria* (F) y en *Polylepis* (P).

In.	Código	Descripción	MR	Secuencia		Ta (° C)	PM (pb)	
				Sentido	Anti-sentido		F	P
SSR 02	Fragaria_ CO380455	<i>Fragaria x</i> <i>ananassa</i>	GA	ACGAGGGTCACGGCTACTAA	TGACCAATCCGAAAGAAATCA	47,4	280	138 a 160
SSR 04	Fragaria_ CO381917	<i>Fragaria x</i> <i>ananassa</i>	TG	TGGTGTGATCAGTGATGGGT	GGACATGCCCTGCTGTTATT	52,6	419	215 a 240
SSR 16	Fragaria_ DV439915	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	AT	ATGCTAACCCAGACAAACGG	ACAAATGGGGGAGTCTTTGA	47,4	391	185 a 230
SSR 17	Fragaria_ CO816927	<i>Fragaria x</i> <i>ananassa</i>	TC	TGATATGACTACCCACGGCA	CATTGAATTGATGCAGCAGG	48,4	241	170 a 200
SSR 19	Fragaria_ DV438520	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	AG	CAGTGCTTTGCTTTTTGCAG	ACACCAGCGCATCTTTCTCT	48,5	347	130 a 140

Tabla 4. Individuos amplificados con iniciadores ISSRs (844-A y 17898-B). Se detalla el código del agrupamiento, si el individuo fue variable en las amplificaciones de SSR's (Ind. Var. SSR's) y para que iniciados amplificó (In. Amplificado).

Agrupamiento	Muestra	Especie	In. Amplificado
SV1-A	SV1-01	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
	SV1-02	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
	SV1-03	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
	SV1-04	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
	SV1-05	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
SV1-B	SV1-06	<i>P. incana</i>	844-A y 17898-B
	SV1-07	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV1-08	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV1-09	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV1-10	Híbrido	844-A y 17898-B
SV1-D	SV1-16	Híbrido	No Amplifica
	SV1-17	Híbrido	17848-B
	SV1-18	Híbrido	17848-B
	SV1-19	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV1-20	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV1-21	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV1-22	<i>P. pauta</i>	17848-B
Ind. Var. SSR's	SV2-15	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
SV2-E	SV2-21	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV2-22	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-23	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-24	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-25	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
Ind. Var. SSR's	SV2-79	Híbrido	844-A y 17898-B
SV2-R	SV2-86	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV2-87	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-88	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV2-89	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-90	Híbrido	844-A y 17898-B
SV2-S	SV2-91	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-92	<i>P. pauta</i>	844-A y 17898-B
	SV2-93	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV2-94	Híbrido	844-A y 17898-B
	SV2-95	<i>P. pauta</i>	17848-B

Tabla 5. Características de los iniciadores utilizados para la amplificación de ISSR's en individuos de *Polylepis*. (Ochoa, *et al.*, 2008)

Nombre	Secuencia 5'-3'	Tm (° C)
844-A	CTCTCTCTCTCTCTAC	54
17898-B	CACACACACACAGT	42,5

Tabla 6. Alelos encontrados tras la amplificación de cinco loci de microsatélites en los individuos muestreados. Se detalla las frecuencias alélicas calculadas para las especies y las localidades (F_{ST} : 0,003), obtenidas a partir del programa POLYSAT (Clark y Jasienniuk, 2011).

Iniciador	Alelo	ESPECIES			LOCALIDAD	
		<i>P. incana</i>	<i>P. pauta</i>	Híbrido	SV1	SV2
SSR 02	138	0,140	0,014	0,004	0,103	0,000
	145	0,000	0,051	0,052	0,037	0,051
	150	0,860	0,923	0,935	0,860	0,938
	160	0,000	0,011	0,009	0,000	0,011
SSR 04	215	0,280	0,160	0,168	0,221	0,162
	230	0,220	0,317	0,330	0,316	0,319
	240	0,500	0,523	0,502	0,463	0,519
SSR 16	185	0,000	0,051	0,065	0,015	0,063
	200	0,000	0,103	0,108	0,037	0,111
	205	1,000	0,806	0,793	0,904	0,793
	220	0,000	0,034	0,030	0,029	0,030
	230	0,000	0,006	0,004	0,015	0,003
SSR 17	170	0,200	0,249	0,328	0,257	0,294
	190	0,500	0,537	0,471	0,478	0,503
	200	0,300	0,214	0,201	0,265	0,202
SSR 19	130	0,060	0,189	0,134	0,154	0,151
	140	0,940	0,811	0,866	0,846	0,849

Tabla 7. Índice de fijación (F_{ST}) para las especies, obtenido a partir de las frecuencias alélicas de alelos de microsatélites; programa POLYSAT (Clark y Jasienniuk, 2011).

	<i>P. incana</i>	<i>P. pauta</i>	Híbridos
<i>P. incana</i>	–		
<i>P. pauta</i>	0,008	–	
Híbridos	0,007	0,002	–

Tabla 8. Análisis de diversidad obtenidos a partir de la amplificación de SSR's. Se detalla, para cada especie y localidad, los índices de Heterocigocidad observada (H_O) y esperada (H_E) y el de Evenness (even) obtenidos a partir del software A-TETRA (Van Puyvelde, *et al.* 2010).

	ESPECIES			LOCALIDAD	
	<i>P. incana</i>	<i>P. pauta</i>	Híbridos	SV1	SV2
Heterocigosidad observada (H_O)	0,400	0,534	0,534	0,508	0,453
Heterocigosidad esperada (H_E)	0,310	0,381	0,366	0,402	0,377
Evenness (even)	0,170	0,027	0,020	0,073	0,013

Tabla 9. Nivel de poliploidía estimado a partir de los alelos encontrados mediante la amplificación de microsatélites, POLYSAT ver. 1.2–1 (Clark y Jasienniuk, 2011).

Muestra	Especie	Número máx. Alelos	Promedio Alelos	Poliploidía Estimada
SV1-01	<i>P. incana</i>	3	2	3
SV1-02	<i>P. incana</i>	3	1,6	3
SV1-03	<i>P. incana</i>	2	1,6	2
SV1-04	<i>P. incana</i>	2	1,2	2
SV1-05	<i>P. incana</i>	2	1,4	2
SV1-06	<i>P. incana</i>	2	1,2	2
SV1-07	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV1-08	<i>P. pauta</i>	3	2,4	3
SV1-09	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV1-10	Híbrido	2	1,6	2
SV1-11	Híbrido	3	1,8	3
SV1-12	Híbrido	3	1,8	3
SV1-13	Híbrido	3	1,6	3
SV1-14	Híbrido	3	1,6	3
SV1-15	Híbrido	3	1,6	3
SV1-16	<i>P. pauta</i>	2	1,8	2
SV1-17	<i>P. pauta</i>	2	1,4	2
SV1-18	Híbrido	3	1,8	3
SV1-19	Híbrido	2	1,4	2
SV1-20	Híbrido	3	1,8	3
SV1-21	Híbrido	3	2	3
SV1-22	Híbrido	3	1,8	3
SV2-01	Híbrido	2	1,4	2
SV2-02	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV2-03	Híbrido	2	1,4	2
SV2-04	Híbrido	2	1,2	2
SV2-05	Híbrido	2	1,4	2
SV2-06	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-07	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-08	Híbrido	2	1,6	2
SV2-09	Híbrido	2	1,4	2
SV2-10	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2

Tabla 9. Continuación

Muestra	Especie	Número máx. Alelos	Promedio Alelos	Poliploidía Estimada
SV2-11	Híbrido	4	2,2	4
SV2-12	<i>P. pauta</i>	3	1,4	3
SV2-13	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-14	<i>P. pauta</i>	4	2,4	4
SV2-15	<i>P. pauta</i>	4	2,6	4
SV2-16	Híbrido	3	1,6	3
SV2-17	Híbrido	4	2,4	4
SV2-18	Híbrido	4	2	4
SV2-19	Híbrido	4	2,4	4
SV2-20	<i>P. pauta</i>	3	2	3
SV2-21	Híbrido	2	1,4	2
SV2-22	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-23	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-24	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-25	<i>P. pauta</i>	2	1,4	2
SV2-26	Híbrido	2	1,4	2
SV2-27	<i>P. pauta</i>	4	2,6	4
SV2-28	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV2-29	Híbrido	4	2,6	4
SV2-30	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV2-31	Híbrido	3	1,8	3
SV2-32	<i>P. pauta</i>	2	1,8	2
SV2-33	Híbrido	3	2	3
SV2-34	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-35	Híbrido	3	1,8	3
SV2-36	Híbrido	2	1,4	2
SV2-37	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV2-38	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-39	Híbrido	3	1,8	3
SV2-40	Híbrido	2	1,8	2
SV2-41	Híbrido	2	1,6	2
SV2-42	Híbrido	2	1,6	2
SV2-43	Híbrido	2	1,2	2

Tabla 9. Continuación

Muestra	Especie	Número máx. Alelos	Promedio Alelos	Poliploidía Estimada
SV2-44	Híbrido	1	1	1
SV2-45	Híbrido	3	1,4	3
SV2-46	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-47	Híbrido	2	1,2	2
SV2-48	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-49	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-50	Híbrido	1	1	1
SV2-51	Híbrido	3	2,2	3
SV2-52	Híbrido	4	2,2	4
SV2-53	Híbrido	2	1,4	2
SV2-54	Híbrido	2	1,4	2
SV2-55	Híbrido	3	1,8	3
SV2-56	Híbrido	3	1,4	3
SV2-57	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-58	<i>P. pauta</i>	2	1,4	2
SV2-59	Híbrido	2	1,4	2
SV2-60	Híbrido	3	1,4	3
SV2-61	Híbrido	3	1,8	3
SV2-62	Híbrido	3	1,6	3
SV2-63	Híbrido	3	2	3
SV2-64	Híbrido	2	1,4	2
SV2-65	Híbrido	2	1,4	2
SV2-66	Híbrido	2	1,6	2
SV2-67	<i>P. pauta</i>	3	1,4	3
SV2-68	Híbrido	3	2,4	3
SV2-69	Híbrido	3	1,8	3
SV2-70	Híbrido	2	1,4	2
SV2-71	Híbrido	3	1,6	3
SV2-72	Híbrido	3	1,6	3
SV2-73	Híbrido	3	1,6	3
SV2-74	<i>P. pauta</i>	2	1,4	2
SV2-75	Híbrido	4	2,4	4
SV2-76	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3

Tabla 9. Continuación

Muestra	Especie	Número máx. Alelos	Promedio Alelos	Poliploidía Estimada
SV2-77	Híbrido	3	1,6	3
SV2-78	<i>P. pauta</i>	4	2,2	4
SV2-79	Híbrido	3	2	3
SV2-80	Híbrido	3	2,2	3
SV2-81	Híbrido	2	1,2	2
SV2-82	Híbrido	3	2	3
SV2-83	Híbrido	3	1,6	3
SV2-84	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-85	Híbrido	2	1,4	2
SV2-86	Híbrido	3	1,6	3
SV2-87	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-88	Híbrido	3	1,6	3
SV2-89	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-90	Híbrido	3	2,2	3
SV2-91	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-92	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-93	Híbrido	3	1,8	3
SV2-94	Híbrido	2	1,4	2
SV2-95	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-96	Híbrido	3	1,8	3
SV2-97	Híbrido	1	1	1
SV2-98	<i>P. pauta</i>	1	1	1
SV2-99	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-100	<i>P. pauta</i>	4	1,8	4
SV2-101	<i>P. pauta</i>	3	1,4	3
SV2-102	Híbrido	2	1,4	2
SV2-103	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-104	<i>P. pauta</i>	3	1,4	3
SV2-105	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-106	<i>P. pauta</i>	3	2	3
SV2-107	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-108	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-109	Híbrido	3	2	3

Tabla 9. Continuación

Muestra	Especie	Número máx. Alelos	Promedio Alelos	Poliploidía Estimada
SV2-110	Híbrido	3	1,6	3
SV2-111	Híbrido	2	1,2	2
SV2-112	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-113	Híbrido	3	1,6	3
SV2-114	<i>P. pauta</i>	1	1	1
SV2-115	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-116	Híbrido	2	1,2	2
SV2-117	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-118	<i>P. pauta</i>	3	2,2	3
SV2-119	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-120	Híbrido	3	1,8	3
SV2-121	Híbrido	3	1,8	3
SV2-122	<i>P. pauta</i>	2	1,6	2
SV2-123	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-124	<i>P. pauta</i>	2	1,2	2
SV2-125	Híbrido	3	1,6	3
SV2-126	Híbrido	2	1,4	2
SV2-127	Híbrido	2	1,4	2
SV2-128	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-129	<i>P. pauta</i>	3	1,6	3
SV2-130	Híbrido	3	1,6	3
SV2-131	<i>P. pauta</i>	3	1,8	3
SV2-132	Híbrido	2	1,2	2
SV2-133	Híbrido	2	1,4	2
SV2-134	<i>P. pauta</i>	2	1,4	2
SV2-135	<i>P. pauta</i>	3	2	3
SV2-136	<i>P. pauta</i>	3	1,4	3
SV2-137	Híbrido	3	1,6	3
I5	<i>P. incana</i>	3	1,8	3
I6	<i>P. incana</i>	3	1,6	3
I9	<i>P. incana</i>	3	1,4	3
P2	<i>P. incana</i>	2	1,4	2

Tabla 10. Porcentaje de pertenencia de cada individuo, STRUCTURE versión 2.2 (Pritchard, *et al.* 2000). Se definen poblaciones genéticas (A y B), con un valor α de 0,05 respectivamente. Se catalogó a un individuo como perteneciente a una población a partir de un 90%. Los individuos con porcentajes menores al establecido se los catalogó como posibles migrantes (C). Se detalla la especie de cada individuo como la pertenencia del mismo a las poblaciones establecidas.

MUESTRA	ESPECIE	POB GEN
SV1-02	<i>P. incana</i>	A
SV1-06	<i>P. incana</i>	A
SV1-13	Híbrido	A
SV1-14	Híbrido	A
SV1-15	Híbrido	A
SV1-17	<i>P. pauta</i>	A
SV1-19	Híbrido	A
SV2-04	Híbrido	A
SV2-07	<i>P. pauta</i>	A
SV2-09	Híbrido	A
SV2-12	<i>P. pauta</i>	A
SV2-21	Híbrido	A
SV2-24	<i>P. pauta</i>	A
SV2-26	Híbrido	A
SV2-34	<i>P. pauta</i>	A
SV2-37	<i>P. pauta</i>	A
SV2-39	Híbrido	A
SV2-43	Híbrido	A
SV2-44	Híbrido	A
SV2-45	Híbrido	A
SV2-46	<i>P. pauta</i>	A
SV2-47	Híbrido	A
SV2-48	<i>P. pauta</i>	A
SV2-50	Híbrido	A
SV2-53	Híbrido	A
SV2-56	Híbrido	A
SV2-58	<i>P. pauta</i>	A

Tabla 10. Continuación

MUESTRA	ESPECIE	POB. GEN
SV2-59	Híbrido	A
SV2-60	Híbrido	A
SV2-61	Híbrido	A
SV2-62	Híbrido	A
SV2-63	Híbrido	A
SV2-65	Híbrido	A
SV2-66	Híbrido	A
SV2-67	<i>P. pauta</i>	A
SV2-69	Híbrido	A
SV2-70	Híbrido	A
SV2-71	Híbrido	A
SV2-72	Híbrido	A
SV2-74	<i>P. pauta</i>	A
SV2-77	Híbrido	A
SV2-81	Híbrido	A
SV2-85	Híbrido	A
SV2-86	Híbrido	A
SV2-87	<i>P. pauta</i>	A
SV2-88	Híbrido	A
SV2-89	<i>P. pauta</i>	A
SV2-91	<i>P. pauta</i>	A
SV2-93	Híbrido	A
SV2-94	Híbrido	A
SV2-95	<i>P. pauta</i>	A
SV2-97	Híbrido	A
SV2-98	<i>P. pauta</i>	A
SV2-99	<i>P. pauta</i>	A
SV2-101	<i>P. pauta</i>	A
SV2-105	<i>P. pauta</i>	A
SV2-107	<i>P. pauta</i>	A
SV2-108	<i>P. pauta</i>	A
SV2-110	Híbrido	A
SV2-111	Híbrido	A
SV2-112	<i>P. pauta</i>	A

Tabla 10. Continuación

MUESTRA	ESPECIE	POB. GEN
SV2-114	<i>P. pauta</i>	A
SV2-115	<i>P. pauta</i>	A
SV2-116	Híbrido	A
SV2-117	<i>P. pauta</i>	A
SV2-119	<i>P. pauta</i>	A
SV2-121	Híbrido	A
SV2-123	<i>P. pauta</i>	A
SV2-124	<i>P. pauta</i>	A
SV2-125	Híbrido	A
SV2-126	Híbrido	A
SV2-127	Híbrido	A
SV2-128	<i>P. pauta</i>	A
SV2-129	<i>P. pauta</i>	A
SV2-130	Híbrido	A
SV2-132	Híbrido	A
SV2-133	Híbrido	A
SV2-136	<i>P. pauta</i>	A
I5	<i>P. incana</i>	A
I6	<i>P. incana</i>	A
I9	<i>P. incana</i>	A
P2	<i>P. incana</i>	A
SV1-01	<i>P. incana</i>	B
SV1-07	<i>P. pauta</i>	B
SV1-08	<i>P. pauta</i>	B
SV1-11	Híbrido	B
SV1-12	Híbrido	B
SV1-16	<i>P. pauta</i>	B
SV1-18	Híbrido	B
SV1-20	Híbrido	B
SV1-21	Híbrido	B
SV2-02	<i>P. pauta</i>	B
SV2-05	Híbrido	B
SV2-06	<i>P. pauta</i>	B
SV2-08	Híbrido	B

Tabla 10. Continuación

MUESTRA	ESPECIE	POB. GEN
SV2-10	<i>P. pauta</i>	B
SV2-11	Híbrido	B
SV2-14	<i>P. pauta</i>	B
SV2-15	<i>P. pauta</i>	B
SV2-17	Híbrido	B
SV2-18	Híbrido	B
SV2-19	Híbrido	B
SV2-20	<i>P. pauta</i>	B
SV2-22	<i>P. pauta</i>	B
SV2-25	<i>P. pauta</i>	B
SV2-27	<i>P. pauta</i>	B
SV2-28	<i>P. pauta</i>	B
SV2-29	Híbrido	B
SV2-30	<i>P. pauta</i>	B
SV2-31	Híbrido	B
SV2-32	<i>P. pauta</i>	B
SV2-33	Híbrido	B
SV2-36	Híbrido	B
SV2-40	Híbrido	B
SV2-42	Híbrido	B
SV2-49	<i>P. pauta</i>	B
SV2-51	Híbrido	B
SV2-52	Híbrido	B
SV2-55	Híbrido	B
SV2-68	Híbrido	B
SV2-75	Híbrido	B
SV2-76	<i>P. pauta</i>	B
SV2-78	<i>P. pauta</i>	B
SV2-79	Híbrido	B
SV2-96	Híbrido	B
SV2-100	<i>P. pauta</i>	B
SV2-102	Híbrido	B
SV2-103	<i>P. pauta</i>	B
SV2-106	<i>P. pauta</i>	B

Tabla 10. Continuación

MUESTRA	ESPECIE	POB. GEN
SV2-109	Híbrido	B
SV2-118	<i>P. pauta</i>	B
SV2-120	Híbrido	B
SV2-122	<i>P. pauta</i>	B
SV2-131	<i>P. pauta</i>	B
SV2-134	<i>P. pauta</i>	B
SV2-135	<i>P. pauta</i>	B
SV2-137	Híbrido	B
SV1-03	<i>P. incana</i>	C
SV1-04	<i>P. incana</i>	C
SV1-05	<i>P. incana</i>	C
SV1-09	<i>P. pauta</i>	C
SV1-10	Híbrido	C
SV1-22	Híbrido	C
SV2-01	Híbrido	C
SV2-03	Híbrido	C
SV2-13	<i>P. pauta</i>	C
SV2-16	Híbrido	C
SV2-23	<i>P. pauta</i>	C
SV2-35	Híbrido	C
SV2-38	<i>P. pauta</i>	C
SV2-41	Híbrido	C
SV2-54	Híbrido	C
SV2-57	<i>P. pauta</i>	C
SV2-64	Híbrido	C
SV2-73	Híbrido	C
SV2-80	Híbrido	C
SV2-82	Híbrido	C
SV2-83	Híbrido	C
SV2-84	<i>P. pauta</i>	C
SV2-90	Híbrido	C
SV2-92	<i>P. pauta</i>	C
SV2-104	<i>P. pauta</i>	C
SV2-113	Híbrido	C

Tabla 11. Resumen del Análisis de la Variación Molecular (AMOVA) de los SSRs para las especies

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Variancia	Porcentaje de Variancia
Entre Poblaciones	2	0,309	0,002	1
Dentro de Poblaciones	160	13,93	0,087	99
Total	162	14,24	0,089	100

ϕ_{PT} : 0,017^{NS} (Intervalo de confianza al 95%)

Tabla 12. Estadísticos descriptivos para todos los loci obtenidos mediante la amplificación de ISSR's

Descriptivo	Valor
Media del tamaño de la muestra	29
Total de loci muestreados	78
Total de loci polimórficos	73
Heterocigosidad media	0,244
Porcentaje de loci polimórficos	93,6

Tabla 13. Patrones de bandas totales, obtenidos mediante la amplificación de ISSR's, entre especies y localidades.

	ESPECIES			LOCALIDAD	
	<i>P. incana</i>	<i>P. pauta</i>	Híbrido	SV1	SV2
No. Bandas Totales	78	78	78	78	78
No. Bandas Polimórficas	33	74	62	56	71
Porcentaje de Bandas Polimórficas	42,3	94,9	79,5	71,8	91,0
No. Bandas Únicas de la Población	–	10	3	7	22
Heterocigosidad Media	0,150	0,268	0,238	0,230	0,258

Tabla 14. Diversidad genética obtenida a partir de la amplificación de ISSR's. Se describe la diversidad de Nei (1973) para las especies y localidades: la diversidad genética en la población total (H_T), la diversidad media dentro de las subpoblaciones (H_S), coeficiente de diferenciación genética relativa a la población total (G_{ST}) y la estimación del flujo génico (N_m), POPGENE ver 1.31 (Yeh, *et al.* 1997).

	H_T	H_S	G_{ST}	N_m
Media para Especies	0,248	0,218	0,120	3,7
Media para Localidades	0,257	0,244	0,052	9,2

Tabla 15. Resumen del Análisis de la Variación Molecular (AMOVA) de los ISSRs para las especies

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Variancia	Porcentaje de Variancia
Entre Poblaciones	2	29,6	0,505	5
Dentro de Poblaciones	26	262,4	10,093	95
Total	28	292,0	10,598	100

ϕ_{PT} : 0,048^{NS} (Intervalo de confianza al 95%)

11.ANEXOS

ANEXO 1. REACTIVOS

BUFFER DE EXTRACCIÓN

- 0,1M Tris HCl base (pH 8)
- 0,03M Na₂ EDTA
- 1,4M NaCl
- 4X CTAB

Aforar con agua MilliQ.

BUFFER TE

- 10mM Tris HCl base
- 0,1mM EDTA

BUFFER TBE 10X (1L)

- 0,89M Tris HCl base
- 0,89M Ácido Bórico
- 0,02M Na₂ EDTA

Aforar con agua MilliQ.

GEL AGAROSA

- Agarosa Ultra Pura
- TBE 1X

El porcentaje del gel se relaciona directamente con los gramos necesarios en un volumen definido. Ej. para un gel de agarosa 3% se utiliza 100 ml de TBE 1X y 3g de Agarosa.

BUFFER DE CARGA (AGAROSA)

- Azul de bromofenol 0,03%
- Cianol xileno FF 0,03%
- Glicerol 30%

SYBR GOLD 5%

- SYBR Gold 10.000X

Aforar con TBE 1X.

ACRILAMIDA 30% (500ml)

- 142,5g Acrilamida
- 7,5g Bis-acrilamida

Aforar con agua MilliQ. Desgasar, filtrar y almacenar a 4° C.

ACRILAMIDA 6% UREA 7M (500ml)

- 210,21g Urea (7M)
- 100ml Acrilamida 30%

Aforados con agua MilliQ. En la polimerización de 75ml de acrilamida 6% urea 7M utilizar 187,5µl de persulfato de amonio 10% y 75µl de TEMED.

SOLUCIÓN ATRACTIVA

- 1500µl Etanol 95%
- 6µl Ácido acético glacial
- 4,5µl Bind-silano

POLIMERIZACIÓN DE ACRILAMIDA

- 75ml Acrilamida 6% Urea 7M
- 75 μ l TEMED
- 187,5 μ l Persulfato de amonio 10%

BUFFER CARGA (ACRILAMIDA) (10ml)

- 9,4ml Formamida
- 500 μ l EDTA (0,2M)
- 50 μ l Cianol xileno
- 50 μ l Azul de Bromofenol

Disolver 50mg de Cianol xileno y Azul de Bromofenol en 1ml de agua MilliQ, respectivamente.

SOLUCIÓN FIJADORA/PARADORA (Ác. Acético 10%) (2,5L)

- 250ml Ácido Acético glacial
- 2250ml Agua MilliQ

Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

SOLUCIÓN DE COLORACIÓN (2,5L)

- 2,5g Nitrato de plata 1%
- 3,5ml Formaldehído 37%

Aforados a 2,5L de agua MilliQ. Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

SOLUCIÓN REVELADORA (2,5L)

- 75g Carbonato de Sodio

- 3,5ml Formaldehído 37%
- 500µl Tiosulfato de Sodio 1,5%

Aforados a 2,5L de agua MilliQ. Almacenar a 4° C y en oscuridad.

ESCALERA 30–330 AFLPS ®

- 5µl Escalera Mix de Reacción de 30–330 AFLPs ®
- 5µl Buffer TE o Agua MilliQ
- 25µl Buffer de carga para acrilamida

Almacenar a -20° C. Antes de usar, denaturar a 70° C por 5 minutos.

ANEXO 2. GLOSARIO

ALELO: cada una de las formas alternativas de un gen o de una región no codante de ADN

ALOPOLIPLOIDE: individuo con dos o más juegos de cromosomas derivados de diferentes especies

APOMIXIS FACULTATIVA: modo de reproducción de las angiospermas en el que coexisten, lado a lado y en el mismo individuo, la reproducción sexual y la reproducción asexual por apomixis.

APOMIXIS: reproducción asexual por medio de semillas, se producen semillas sin que ocurra meiosis ni fertilización generando descendientes genéticamente idénticos a la planta madre.

CODOMINANTE: se visualizan ambos alelos, en organismos diploides, mediante un sistema de marcadores genéticos de tal forma que se detectan genotipos homocigotos y heterocigotos.

COMPLEJO AGÁMICO: hibridación frecuente entre especies sexuales y con apomixis facultativa

DESEQUILIBRIO LIGADO: asociación no randómica entre alelos de diferentes loci

DOMINANTE: se visualiza solo un alelos, en organismos diploides, mediante un sistema de marcadores genéticos de tal forma que solo se detectan dos genotipos, ya sea presencia o ausencia de bandas.

ENDOGAMIA: cruce entre individuos emparentados (parentales e hijos)

EQUILIBRIO LIGADO: el logro de las frecuencias genotípicas en una población que indica que la recombinación entre dos o más loci han llegado a un punto en el que sus alelos son encontrados en combinaciones genotípicas al azar

ESPECIE (BIOLÓGICA): grupo de poblaciones naturales que se reproducen o tienen el potencial de reproducirse entre ellas y que están reproductivamente aisladas de otras especies (Mayr, 1942)

ESPECIE (FILOGENÉTICA): reconoce distintas poblaciones morfológicas, biogeográficas y ecológicamente distintas como especies mientras el intercambio genético con otras poblaciones no inhiba el desarrollo independiente de la evolución de estas poblaciones (Nixon y Wheeler, 1990).

ESPECIE (TIPOLOGICA): entidad que se diferencia de otras especies por características constantes, en especial morfológicas.

FENOTIPO: características o apariencia de un individuo influenciada por el ambiente y el genotipo del organismo.

FLUJO GÉNICO: movimiento de genes de una población a otra por medio del cruce de individuos en las dos poblaciones.

GENOTIPO: la constitución genética de un organismo o de un grupo de organismos con respecto a un carácter.

GLABRO/A: desprovisto de pelo, lampiño.

HAPLOTIPO: una sola copia de una secuencia de ADN. Generalmente hace referencia a más de un gen.

HETEROCIGOSIDAD: proporción de heterocigotos en un locus, o loci heterocigotos en un individuo. Se aproxima a la variación genética

HIBRIDACIÓN: cruce entre diferentes especies

HIPANTO: tálamo acopado, en cuyo extremo están perianto y androceo.

INTROGRESIÓN: movimiento de genes de una especie a otra como consecuencia de un proceso de hibridación interespecífica seguido de retrocruzamiento.

LOCUS: posición específica en cromosomas homólogos. Incluye cualquier región codante (genes) o no codante de los cromosomas (pl. Loci)

MARCADOR MOLECULAR: cualquier característica genética que pueda ser medida y cuantificada. Son visualizados usando procesos de laboratorio que detectan variación ya sea directamente a nivel de ADN o indirectamente por productos de la transcripción y traducción de ADN como aloenzimas o caracteres morfológicos

MONOFILÉTICO: se dice de un grupo cuyos miembros descienden de la misma especie ancestral que incluye a todos sus descendientes de esta especie

PANMIXIA: reproducción dentro de la población sin importar el fenotipo o el genotipo de la pareja

POLIMORFISMO: o variación genética, es la presencia de uno o más formas alternativas de un locus o loci. Toda la variación genética refleja la variación en las secuencias de nucleótidos

POLIPLOIDIA: variación en la que el número del juego de cromosomas (n) es mayor que el número diploide ($2n$).

SERÍCEO/A: con pelos finos, cortos y aplicados a la superficie del órgano, con cierto brillo como la seda.

SIMPATRÍA: especies o poblaciones cuyas distribuciones geográficas coinciden y se sobrelapan

TURBINADO: en forma de trompo o sea de cono alargado invertido.

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Stephany Daniela Villota Villafuerte, CI 171726036-6 autor del trabajo de graduación titulado “Evaluación de la dinámica poblacional en especies simpátricas de *Polylepis* en el Páramo de la Virgen, Provincia de Napo y Pichincha mediante marcadores moleculares”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADA EN CIECIAS BIOLÓGICAS en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENECYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de Universidad.

Quito, 21 de Mayo de 2012

Srta. Stephany Villota

C.I. 171726036-6