

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estructura genética de poblaciones transandinas de

***Prestoea acuminata* (Willd.) H. E. Moore**

en los Andes septentrionales de Ecuador

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en

Ciencias Biológicas

SEBASTIÁN PABLO ESCOBAR VÁSQUEZ

Quito, 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato Sebastián Pablo Escobar Vásquez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Rommel Montúfar

Quito, 22 de Junio del 2011

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, Sebastián Pablo Escobar Vásquez, C. I. 171837166-7, autor del trabajo de graduación intitulado: “Estructura genética de poblaciones transandinas de *Prestoea acuminata* (Willd.) H. E. Moore en los Andes septentrionales de Ecuador” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS 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 SENESCYT 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 del sitio web Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 22 de Junio del 2011

Sr. Sebastián Pablo Escobar Vásquez

C. I. 171837166-7

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo agradecer a mis padres y a mi familia en general por hacerme la persona que soy y por haberme apoyado siempre.

Agradezco al Dr. Rommel Montúfar por permitirme ser parte del laboratorio de Ecología Molecular, y a mis compañeros de laboratorio por brindarme su ayuda y apoyo en la realización de este trabajo.

A Sofía y a mis amigos, por apoyarme y estar en los buenos y malos momentos durante la realización de mi carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
3.1.	LA CORDILLERA DE LOS ANDES Y SU INFLUENCIA SOBRE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS ESPECIES	3
3.2.	<i>Prestoea acuminata</i> COMO MODELO BIOLÓGICO	5
3.2.2.	CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.	6
3.2.3.	EXPLOTACIÓN DE <i>Prestoea acuminata</i> PARA LA OBTENCIÓN DE PALMITO	7
3.3.	MARCADORES MOLECULARES	8
3.3.1.	ESTUDIOS MOLECULARES PREVIOS EN <i>Prestoea acuminata</i>	9
3.3.2.	MICROSATÉLITES COMO MARCADOR MOLECULAR	10
3.4.	OBJETIVOS	12
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1.	OBTENCIÓN DE MUESTRAS	13
4.1.1.	DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE COLECCIÓN	13
4.1.2.	CARACTERÍSTICAS DE LOS SITIOS DE COLECCIÓN	13

4.1.2.1.	ESTRIBACIONES ORIENTALES	13
4.1.2.2.	ESTRIBACIONES OCCIDENTALES	15
4.1.3.	IDENTIFICACIÓN Y COLECCIÓN DE MUESTRAS	16
4.2.	EXTRACCIÓN DE ADN	16
4.3.	OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES	17
4.3.1.	PRUEBAS DE TRANSFERIBILIDAD	17
4.3.2.	ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PCR	18
4.3.3.	OBTENCIÓN, MEDICIÓN Y TABULACIÓN DE DATOS	18
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	19
4.4.1.	DESEQUILIBRIO LIGADO	19
4.4.2.	EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	20
4.4.3.	DIVERSIDAD GENÉTICA	21
4.4.4.	DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	22
4.4.5.	ANÁLISIS DE VARIANCIA MOLECULAR (AMOVA)	24
4.4.6.	AISLAMIENTO POR DISTANCIA	25
5.	RESULTADOS	26
5.1.	OBTENCIÓN DE ADN	26

5.2.	OBTENCIÓN DE DATOS	26
5.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	27
5.3.1.	DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG	27
5.3.2.	DIVERSIDAD GENÉTICA	28
5.3.3.	DIFERENCIACIÓN Y VARIACIÓN GENÉTICA	28
6.	DISCUSIÓN	31
6.1.	USO DE MARCADORES MOLECULARES	31
6.2.	ESTRUCTURA POBLACIONAL DE <i>Prestoea acuminata</i>	32
6.3.	LOS ANDES COMO BARRERA AL FLUJO GÉNICO EN <i>Prestoea acuminata</i>	36
7.	LITERATURA CITADA	42
8.	FIGURAS	52
9.	TABLAS	60
10.	ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1.** Distribución de *Prestoea acuminata* (Henderson *et al.*, 1995) 52
- FIGURA 2.** Mapa de los lugares donde se colectó muestras de *P. acuminata* 52
- FIGURA 3.** Verificación de la calidad y cantidad de la solución B del ADN (enmarcado en N10) obtenido en 10 muestras de la población Nanegalito (N1-N10) de *P. acuminata* visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb) 53
- FIGURA 4.** Amplificación de primers de *E. edulis* (control negativo, EE2, EE3, EE5, EE8, EE9, EE15 y EE23) en *P. acuminata* con una muestra al azar, visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb). Las bandas pertenecientes a los microsatélites amplificados se observan sobre los 200 pb con el primer EE3, y sobre los 100 pb con el primer EE15 (bandas enmarcadas) 53
- FIGURA 5.** Amplificación de muestras de Pahuma (P1-P20) y parte de Mindo (M1-M11) de *P. acuminata* con el primer polimórfico Ob19 visualizado en un gel de poliacrilamida 6% y úrea 5M con una escalera *10bp* (bandas cada 10 pb). Se observan los cinco alelos obtenidos (enmarcados) con el primer Ob19 en las 10 poblaciones 54

FIGURA 6. PCA realizado con la matriz de D (Jost, 2008) entre 10 poblaciones de *P. acuminata* obtenido con el programa GenAlEx. Las poblaciones del occidente de los Andes son Cotopaxi, Nanegalito, Mindo, Pahuma y Chiriboga; mientras que las poblaciones del oriente del los Andes son Borja, El Chaco, Cosanga, Baeza (carretera) y Baeza (antenas). Porcentaje de variación en el primer eje: 57.61%; porcentaje de variación en el segundo eje: 19.96%

55

FIGURA 7. PCA realizado con la matriz de F_{ST} entre 10 poblaciones de *P. acuminata* obtenido con el programa GenAlEx. Las poblaciones del occidente de los Andes son Cotopaxi, Nanegalito, Mindo, Pahuma y Chiriboga; mientras que las poblaciones del oriente del los Andes son Borja, El Chaco, Cosanga, Baeza (carretera) y Baeza (antenas). Porcentaje de variación en el primer eje: 50.24%; porcentaje de variación en el segundo eje: 18.46%

56

FIGURA 8. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata*

57

FIGURA 9. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008) entre las poblaciones del occidentales (Nanegalito, Chiriboga, Pahuma, Míndo y Cotopaxi). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata* 58

FIGURA 10. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008) entre las poblaciones orientales (El Chaco, Cosanga, Borja, Baeza-antenas y Baeza-carretera). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata* 59

LISTA DE TABLAS

TABLA 1.	Primers amplificados bajo el protocolo PCR original	60
TABLA 2.	Primers polimórficos utilizados en <i>P. acuminata</i> con su respectivo protocolo PCR	62
TABLA 3.	Valores p del análisis de desequilibrio ligado par cada par de loci en todas las poblaciones (método de Fisher) de <i>P. acuminata</i> obtenidos con el programa GenePop	64
TABLA 4.	Resumen de los resultados de diversidad genética de <i>P. acuminata</i> obtenidos con el programa Arlequin	64
TABLA 5.	Matriz de valores D (Jost, 2008) entre poblaciones de <i>P. acuminata</i> con su respectiva significación estadística al 5% obtenida en el programa SPADE.	65
TABLA 6.	Matriz de valores F_{ST} con su respectiva significación estadística al 5% entre poblaciones de <i>P. acuminata</i> obtenida en el programa Arlequin	66
TABLA 7.	AMOVA de las poblaciones de <i>P. acuminata</i> calculado en el programa Arlequin	67
TABLA 8.	AMOVA de las poblaciones occidentales de <i>P. acuminata</i> calculado en el programa Arlequin	67
TABLA 9.	AMOVA de las poblaciones orientales de <i>P. acuminata</i> calculado en el programa Arlequin	67

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1.	Protocolo de extracción de ADN con el kit <i>PureLink™ Genomic Plant DNA Purification</i> de Invitroge	68
ANEXO 2.	Preparación de geles de agarosa 1% con bromuro de etidio al 5%	70
ANEXO 3.	Preparación y tinción de los geles de poliacrilamida	71

1. RESUMEN

La cordillera de los Andes es una zona donde se concentra gran diversidad biológica y representa una barrera geográfica al flujo génico de las especies. Se estudió la estructura genética de poblaciones transandinas de *Prestoea acuminata* var. *acuminata* de los bosques montanos de las estribaciones orientales y occidentales de los Andes, y la influencia de la cordillera sobre el flujo génico entre las poblaciones. Las poblaciones occidentales presentaron mayor diversidad genética que las orientales debido probablemente a un mejor estado de los bosques. Los análisis de diferenciación genética se los realizó con el estadístico D de Jost. Se observó que las poblaciones occidentales poseen una estructura genética homogénea y se encuentran genéticamente diferenciadas de las orientales. Las poblaciones orientales presentan diferenciación genética entre sí debido a una alteración en el flujo génico entre estas poblaciones. Los Andes representan un barrera efectiva al flujo génico en *Prestoea acuminata* debido a la falta de dispersores, pese a que esta especie presenta aislamiento por distancia. Probablemente después del levantamiento de los Andes las poblaciones de *Prestoea acuminata* quedaron aisladas por la cordillera, y hasta hoy en día se conserva parte de esa estructura genética ancestral lo que podría explicar la presencia de aislamiento por distancia. Sin embargo los Andes han bloqueado en gran medida el flujo génico entre poblaciones orientales y occidentales, permitiendo una lenta diferenciación molecular.

Palabras clave: barrera geográfica, diferenciación molecular, estructura genética, flujo génico, *Prestoea acuminata*, poblaciones transandinas

2. ABSTRACT

The Andes cordillera is an area where great biological diversity is concentrated and represents a geographic barrier for gene flow. Genetic structure of trans-andean populations of *Prestoea acuminata* var. *acuminata* from montane forests on western and eastern Andean slopes, and the influence of the cordillera on gene flow between populations were studied. Western populations showed greater genetic diversity than those in the eastern slopes probably due to a better condition of the forests. Genetic differentiation analysis were run with Jost's D statistical. Western populations showed an homogeneous genetic structure and are genetically differentiated from eastern populations, which show genetic differentiation between them due to a gene flow alteration. The Andes represent an effective geographic barrier for gene flow in *Prestoea acuminata* due to a lack of dispersers, even though this species shows isolation by distance. After Andean uplift, *Prestoea acuminata* populations were isolated by the cordillera, and even today part of that ancestral genetic structure is conserved which could explain the presence of isolation by distance. However, the Andes have blocked gene flow between oriental and occidental populations, allowing a slow process of molecular differentiation.

Key words: gene flow, genetic structure, geographic barrier, molecular differentiation, *Prestoea acuminata*, trans-andean populations

3. INTRODUCCIÓN

3.1. LA CORDILLERA DE LOS ANDES Y SU INFLUENCIA SOBRE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS ESPECIES.

La cordillera de los Andes es una cadena montañosa que se extiende por 5000 kilómetros a lo largo de la costa oeste de Sudamérica (Gregory-Wodzicki, 2000). En los Andes se concentra una gran diversidad y endemismo, debido en parte a la gran variedad de nichos ecológicos y a su historia de eventos geológicos (Trénel *et al.*, 2008). La cordillera de los Andes es considerada una barrera geográfica que impide que exista flujo génico entre poblaciones (Trénel *et al.*, 2008), y este tipo de influencia puede causar vicariancia al separar poblaciones físicamente.

Según Joseph *et al.* (1995), parte de la diversidad en los Andes tropicales de especies se debe a la vicariancia de especies ancestrales. La distribución de especies transandinas ha sido objeto de interés en el estudio de la biogeografía andina y de la diversidad (Trénel *et al.*, 2008). Existe gran cantidad de especies animales, entre éstas aves (Brumfield & Capparella, 1996; Cheviron *et al.*, 2005; Weir, 2009), anfibios (Bernal *et al.*, 2005; Weigt *et al.*, 2005), mariposas (Brower, 1994), serpientes (Zamudio & Greene, 1997) murciélagos (Hoffmann & Baker, 2003); y plantas (Trénel *et al.*, 2008) que presentan una distribución al este y oeste de esta cordillera. Jørgensen & León-Yáñez (1999) reportan que 1438 especies de plantas vasculares de tierras bajas presentes en Ecuador (18% del total de plantas vasculares del Ecuador) tienen una distribución transandina. Balslev (1988) también realizó un trabajo sobre los patrones de distribución de 536 especies de plantas del Ecuador (aproximadamente el 2% del total de plantas presentes en Ecuador) pertenecientes a tres categorías: tierras bajas (226

especies, 0-900 msnm), de mediana elevación (260 especies, 900-3000 msnm) y de tierras altas (50 especies, 3000+ msnm). El porcentaje de especies con distribución transandina en tierras bajas fue del 52%, en tierras de mediana elevación fue del 53% y en tierras altas fue del 72%. Estos datos indican que aproximadamente la mitad de especies vegetales presentes en el Ecuador han aparecido por divergencia debido al levantamiento de los Andes, y la otra mitad después que los Andes se convirtieran en una barrera para la migración (Balslev, 1988).

Existen dos hipótesis para explicar esta distribución transandina: (1) hipótesis de Vicariancia por el levantamiento de los Andes, la cual sostiene que este tipo de distribución se debe a la vicariancia causada por el levantamiento de la cordillera andina; (2) hipótesis de la dispersión a través de los Andes, que sostiene que la distribución alopátrica de las especies se debe al paso de flujo génico a través de los Andes por zonas de menor altitud, una vez que la cordillera estaba en su posición actual (Chapman, 1926).

P. acuminata es una especie de palmera que tiene poblaciones separadas por los Andes, probablemente limitando el flujo génico lo que puede promover diferenciación genética entre poblaciones (Weir, 2009). Sin embargo existen zonas de menor altura como valles interandinos o depresiones por donde se puede dar un intercambio genético entre poblaciones transandinas (Trénel *et al.*, 2008). Este tipo de estudios son escasos en palmeras pese a que existen varias especies que presentan este tipo de distribución como *Oenocarpus bataua*, *Iriarteia deltoidea* o *Socratea exorrhiza* (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995); lamentable no se conoce el impacto de la cordillera de los Andes sobre estas especies y específicamente la barrera que representan al flujo génico. El conocer la forma en que la diversidad genética de una especie está distribuida entre poblaciones es importante no sólo en

el área de la biología evolutiva o ecología, sino también en la biología de la conservación (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

3.2. *Prestoea acuminata* COMO MODELO BIOLÓGICO.

3.2.1. TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN.

El género *Prestoea* pertenece a la tribu Euterpeae, y se encuentra filogenéticamente relacionado al género *Euterpe* (Dransfield *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 1995). Los tallos en este género son de tamaño mediano (de 5 a 15 metros), cespitosos o por lo menos con pequeños brotes en la base, y generalmente se encuentran cubiertos con peciolos de hojas viejas. Las palmeras de este género presentan de 4 a 12 hojas pinnadas, pinnas lanceoladas y sus vainas no forman un filóscapo o *crownshaft*, a excepción de *Prestoea acuminata* que forma un semi-filóscapo. Las inflorescencias son ramificadas y comúnmente erectas o arqueadas. Las raquillae no están cubiertas con pelos como en *Euterpe*, y tienden a cambiar de coloración, de blanco en etapa de floración a rojizo cuando dan frutos. Las flores son unisexuales y se encuentran triadas (una flor femenina con dos masculinas). Los frutos son pequeños, de forma circular y color oscuro (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995). El género *Prestoea* tiene nueve especies distribuidas en las Antillas, Centroamérica y Sudamérica, la mayoría se encuentran en zonas montañosas, pero algunas en zonas húmedas como en la Amazonía (Borchsenius *et al.*, 1998). En Ecuador se han reportado seis especies: *P. acuminata*, *P. carderi*, *P. decurrens*, *P. ensiformis*, *P. pubens* y *P. schultzeana* (Borchsenius *et al.*, 1998).

Prestoea acuminata es una palma de sotobosque, con distribución neotropical y se la encuentra en las Antillas, Centro América y en las estribaciones andinas de Colombia a Bolivia en un rango altitudinal desde los 800 hasta los 2600 msnm (Borchsenius *et al.*, 1998; Borchsenius & Moraes, 2006; Van den Eynden *et al.*, 2004; Figura 1). En Ecuador se ha reportado en las provincias de Azuay, Carchi, Cotopaxi, Esmeraldas, Loja, Morona-Santiago, Napo, El Oro, Pastaza, Pichincha y Zamora (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995). Se reconocen tres variedades de esta especie pero en Ecuador solo se ha reportado la variedad *P. acuminata* var. *acuminata*, que difiere de las otras dos variedades por sus raquillae angulares y sus frutos más pequeños (Borchsenius *et al.*, 1998). Esta variedad se encuentra ampliamente distribuida en Centroamérica y en los Andes en los boques montanos de las estribaciones orientales y occidentales (Svenning & Balslev, 1998; Van den Eynden *et al.*, 2004; Borchsenius & Moraes, 2006).

3.2.2. CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS.

P. acuminata, conocida como “Palmito de Castilla”, es una palma monoica, no domesticada, que puede medir en su etapa adulta hasta 15 metros de altura, su tronco puede tener de 4 a 20 centímetros de diámetro, sus hojas tienen una longitud desde 1 a 2.5 metros, y cada hoja presenta entre 30 a 80 pinnas rectas y lanceoladas por lado. *P. acuminata* tiene un hábito mayormente cespitoso (varios clones o troncos forman parte de un solo individuo), sin embargo también se presentan en forma solitaria. Presenta un semi-filóscapo de color morado a morado-verduzco, las inflorescencias son horizontales, el pedúnculo floral tiene entre 3 y 20 centímetros de largo, las raquillae miden de 23 a 117 centímetros de largo, y los frutos tienen

entre 1 y 1,8 centímetros de diámetro (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995). No existen estudios sobre polinización en *P. acuminata*, pero en *P. schultzeana* se ha observado que las flores son visitadas por coleópteros, dípteros, lepidópteros e himenópteros (Ervik & Feil, 1997). Se han visto pequeños coleópteros visitar las flores de *P. acuminata* (observación personal). Estrada-Villegas *et al.* (2007) reporta la dispersión de semillas de *P. acuminata* por medio de murciélagos y aves en un bosque montano en Colombia, pero no indica qué tipo de ave o murciélago. En *Euterpe precatoria*, que posee frutos pequeños parecidos a *Prestoea*, se conoce que algunas aves como pavas silvestres, mamíferos pequeños y peces (cuando se producen inundaciones en el bosque) son responsables de la dispersión de semillas (Johnson, 1996; Peña, 1996)

3.2.3. EXPLOTACIÓN DE *Prestoea acuminata* PARA LA OBTENCIÓN DE PALMITO.

En el Ecuador en los años 80's, *P. acuminata* fue cosechada en gran cantidad para la comercialización de su palmito, ya sea para exportación o para el consumo interno. La cosecha se realizaba de poblaciones naturales entre los 1000 y 2000 metros de altitud sin la implementación de un plan de manejo (Borchsenius & Moraes, 2006). Para la obtención de palmito, los troncos son talados (Knudsen, 1995) y no vuelven a crecer, por lo que se opta por talar los clones para no matar al individuo. Según Knudsen (1995) el lugar más afectado por la cosecha de palmito son los bosques montanos alrededor de Mindo, al noroeste de los Andes ecuatorianos. Se reporta que para la cosecha se organizaban grupos de entre 7 y 10 personas que diariamente lograban cosechar unos 200 palmitos (100 si el bosque era muy denso), y esta actividad era realizada 4 días a la semana (Knudsen, 1995). Se estima que en el año 1991, la

exportación total de palmito (*Prestoea acuminata* y *Euterpe oleraceae*) de Ecuador alcanzó las 900 toneladas métricas a un valor de cerca de \$US 1,5 millones, sin embargo se desconoce exactamente el aporte de *P. acuminata* en estos valores (Pedersen, 1993). Actualmente se cosechan palmitos de poblaciones comerciales pertenecientes a la especie *Bactris gasipaes* (Borchsenius & Moraes, 2006); sin embargo, en el noroccidente de Pichincha se mantiene la cosecha de palmito proveniente de poblaciones silvestres en menor escala.

3.3. MARCADORES MOLECULARES.

Un marcador molecular es una herramienta que genera datos (Freeland, 2005) a partir de templados de ADN, y puede definirse como un punto conocido dentro de los cromosomas que permite el seguimiento de una secuencia específica de ADN (Semagn *et al.*, 2006). Los marcadores moleculares no deben considerarse como genes debido a que, pese a transmitirse de una generación a otra mediante leyes de herencia mendeliana, son secuencias de ADN neutras que no tienen importancia biológica y no producen cambio en el fenotipo del individuo (Semagn *et al.*, 2006).

Debido a que se han desarrollado gran cantidad de marcadores moleculares, es importante considerar la respuesta que buscamos responder, y la naturaleza del marcador antes de elegir uno. Por ejemplo, para trabajar con individuos cercanamente relacionados a nivel genético se necesitan marcadores altamente variables (Freeland, 2005). Otros aspectos a considerar son el precio para desarrollar y sintetizar marcadores, la facilidad para implementar la técnica de uso de los marcadores, la capacidad para obtener los mismos datos al repetir el procedimiento, entre otros.

Los diferentes marcadores pueden agruparse dentro de dos categorías: dominantes y codominantes. Los marcadores dominantes permiten identificar un solo alelo, que es el dominante. Algunos marcadores dominantes son los RAPDs, AFLPs, entre otros. Los marcadores codominantes nos permiten identificar todos los alelos presentes en un locus en particular (2 alelos en organismos diploides, 3 en triploides, etc.) por lo que suelen ser más precisos (Freeland, 2005). Algunos marcadores codominantes son los RFLPs, microsatélites, entre otros.

3.3.1. ESTUDIOS MOLECULARES PREVIOS EN *Prestoea acuminata*.

P. acuminata es una palma que posee una amplia distribución, sin embargo se ha reportado una limitada variabilidad morfológica (Henderson *et al.*, 1995). Este patrón es en parte, el resultado de un escaso número de estudios que exploren la variabilidad intraespecífica. A nivel genético, no existe información sobre estudios poblacionales, y tampoco se han desarrollado marcadores moleculares para esta especie. La ausencia de información molecular es un limitante para la cosecha, manejo y conservación de un recurso, productor de palmito de alta calidad. Al realizar una búsqueda bibliográfica, se evidencia la falta de trabajos que implementen el uso de técnicas moleculares en los que *P. acuminata* sea el organismo principal de estudio. Existen algunos trabajos en los que se utiliza a *P. acuminata*, como el de Hahn (2002) y Roncal *et al.* (2008) donde se realizan filogenias moleculares de palmeras, o el de Montúfar *et al.* (2006) donde se prueba la transferibilidad de primers desarrollados para *Oenocarpus bataua* en *P. acuminata* y otras palmeras.

3.3.2. MICROSATÉLITES COMO MARCADOR MOLECULAR.

Los microsatélites o SSRs (simple sequence repeat) son secuencias sumamente cortas de ADN (2-5 pares de bases o más) que se repiten una junto a otra (en tándem) y generalmente tienen un tamaño entre 100 y 300 pares de bases (Watson *et al.*, 2007). Un ejemplo de un microsatélite puede ser el dinucleótido (AG) que se repite diez veces en tándem (AGAGAGAGAGAGAGAGAGAG), y su secuencia complementaria será (CT)₁₂. Al ser marcadores codominantes, permiten diferenciar entre individuos homocigotos (un alelo) o heterocigotos (en el caso de *P. acuminata*, 2 alelos por ser un organismo diploide) (Freeland, 2005).

Estas repeticiones en tándem se encuentran dentro del ADN nuclear, pero también se han encontrado dentro de cloroplastos y mitocondrias (Freeland, 2005). Los microsatélites presentan una alta tasa de mutación de aproximadamente 10^{-3} (Balloux & Lugon-Moulin, 2002), lo que les da la capacidad de perder o ganar bases durante la replicación del ADN (Semagn *et al.*, 2006) y ha generado el desarrollo de modelos de mutación. Entre los principales tenemos el Modelo de Mutación Paso a Paso (Stepwise Mutation Model – SMM; Kimura & Ohta, 1978) que sostiene que cada mutación crea un alelo nuevo al añadir o borrar un motivo del microsatélite con la misma probabilidad de ganar o perder pares de bases. Por ende, los alelos de diferentes tamaños van a ser más o menos parecidos entre sí dependiendo de su similitud en cuanto a pares de bases. Otro modelo muy conocido es el Modelo de Alelos Infinitos (Infinite Alleles Model – IAM; Kimura & Crow, 1964) que sostiene que cada mutación da como resultado un nuevo alelo con una tasa u . Bajo este modelo no existe homoplasia, y los alelos idénticos comparten el mismo ancestro y son idénticos por descendencia, lo que diferencia a este modelo de otros (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

La naturaleza altamente polimórfica de los microsatélites, debido a su alta tasa de mutación (Semagn *et al.*, 2006), y el hecho de que existan miles en todo el genoma (Watson *et al.*, 2007) los convierte en excelentes marcadores para identificar cambios genéticos recientes a nivel de individuos o poblaciones (Freeland, 2005). También hay que considerar su naturaleza codominante como una de sus ventajas.

Una de las principales desventajas que presenta este tipo de marcador es el alto precio, y el trabajo que se debe invertir para desarrollarlos, sin embargo puede darse una transferibilidad de marcadores desarrollados para una especie a otra cercanamente relacionada. Esto se debe a que las secuencias que flanquean a los microsatélites suelen ser conservadas entre especies relacionadas, lo que significa que al desarrollar marcadores para cierta especie, podemos usarlos en otras cercanas (Freeland, 2005) modificando ciertas variables de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tales como la temperatura de hibridación, la cantidad de magnesio utilizada, entre otros.

Los datos que se obtienen con estos marcadores son las longitudes, en pares de bases, de los fragmentos amplificados mediante una PCR sencilla en la que se utilizan 2 primers de oligonucleótidos (un *forward* que va en sentido 5'-3', y un *reverse* que va en sentido 3'-5') que hibridizan sobre las secuencias flanqueantes a los microsatélites (Watson *et al.*, 2007), de ahí su naturaleza específica. Los fragmentos amplificados pueden observarse al realizar una electroforesis sobre geles de alta definición (Semagn *et al.*, 2006).

3.4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Conocer el impacto de los Andes, como barrera geográfica, en la biogeografía de poblaciones transandinas de *P. acuminata*

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Analizar la estructura genética de las poblaciones transandinas de *P. acuminata*.

Determinar la presencia o ausencia de flujo génico entre poblaciones transandinas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS.

4.1.1. DETERMINACIÓN DE LOS SITIOS DE COLECCIÓN.

Con el objetivo de obtener muestras en los bosques montanos al este y oeste de los Andes septentrionales en Ecuador, se utilizó la base de datos del Herbario de la Universidad Católica (QCA) para determinar las localidades donde *P. acuminata* había sido colectada con anterioridad. Se encontró varias localidades al norte y sur del Ecuador, pero se optó por realizar la colección en las provincias de Pichincha, Napo y Santo Domingo de los Tsáchilas y Cotopaxi debido a que en estas provincias se observó un mayor número de registros.

Se seleccionó 5 poblaciones en las estribaciones andinas orientales y 5 poblaciones en las occidentales, dando un total de 10 poblaciones. La población fue definida como una localidad geográfica en donde los individuos están genéticamente relacionados. Las poblaciones elegidas al oeste fueron Baeza (carretera), Baeza (antenas), Cosanga, El Chaco y Borja; mientras que las poblaciones escogidas al este fueron Pahuma, Nanegalito, Mindo, Chiriboga y Cotopaxi (Figura 2).

4.1.2. CARACTERÍSTICAS DE LOS SITIOS DE COLECCIÓN.

4.1.2.1. ESTRIBACIONES ORIENTALES.

(1) Baeza (carretera): localidad ubicada en la carretera Quito-Baeza, aproximadamente a unos dos km antes de llegar a la “Y” de Baeza desde Quito. Es una zona que presenta parches de

vegetación rodeados por potreros. La altitud es de 1838 msnm y su ubicación tomada con geoposicionador (GPS) es 0,46387°S 77,90755°O.

(2) Baeza (antenas): al llegar a Baeza Antigua, se tomó un camino secundario que llega a las antenas de radio, y en el trayecto se localizó un remanente de vegetación con una población de *P. acuminata*. El remanente de vegetación estaba rodeado por potreros. La altitud es de 1989 msnm y su ubicación tomada GPS es 0,47230°S 77,89950°O.

(3) Cosanga: se recorrió la carretera Baeza-Cosanga con el objetivo de coleccionar muestras a lo largo de la vía, debido a que no se observaron parches de vegetación como en Baeza. Los individuos coleccionados se encontraron en su mayoría dentro de potreros o bosques disturbados. El rango altitudinal al que se coleccionó las muestras fue de 1735 hasta 2139 msnm , y el rango de ubicación fue desde 0,65212°S 77,79101°O hasta 0,60343°S 77,84441°O.

(4) El Chaco: se recorrió la carretera Borja-El Chaco. Los individuos coleccionados se encontraron mayormente dentro de potreros o bosques alterados, a excepción de algunos coleccionados dentro de un remanente de vegetación. El rango altitudinal al que se coleccionó las muestras fue desde 1708 hasta 1838 msnm, y el rango de ubicación fue desde 0,28607°S 77,76840°O hasta 0,29776°S 77,77688°O.

(5) Borja: Se localizó un camino secundario que une la vía Baeza-Cosanga con la vía Baeza-El Chaco cerca del pueblo de Borja. Se coleccionó de la misma forma que en las localidades Cosanga y El Chaco, pero se encontró varios parches de vegetación con gran cantidad de palmito, y también individuos dentro de potreros. El rango altitudinal al que se coleccionó las muestras fue desde 1706 hasta 1905 msnm, y el rango de ubicación fue desde 0,46177°S 77,86309°O hasta 0,45121°S 77,85974°O.

4.1.2.2. ESTRIBACIONES OCCIDENTALES.

(1) Pahuma: se tomó la vía Quito-Nanegalito, y los primeros palmitos observados en el camino fueron en La Reserva Florística Pahuma. Se colectó individuos dentro de la reserva, conformada por bosque primario. La altitud es de 1960 msnm y su ubicación tomada GPS es $0,02435^{\circ}\text{N } 78,63230^{\circ}\text{O}$.

(2) Nanegalito: se colectó individuos en los alrededores de la Nanegalito, mayoritariamente en zonas alteradas debido a la gran actividad humana. La altitud promedio es de 1500 msnm y su ubicación tomada GPS es $0,06326^{\circ}\text{N } 78,68373^{\circ}\text{O}$.

(3) Mindo: se recorrió las vías secundarias que salen de Mindo hacia zonas poco pobladas con el objetivo de encontrar individuos. Se colectó muestras dentro de potreros, pero también dentro de bosques privados poco alterados. La altitud es de 1382 msnm y su ubicación tomada GPS es $00,06353^{\circ}\text{S } 78,77402^{\circ}\text{W}$.

(4) Chiriboga: la igual que en Cosanga y El Chaco, al este de la cordillera, se realizó la colección en la vía Chiriboga-Santo Domingo de los Tsáchilas. Se colectó las muestras a lo largo de la vía en bosques mayoritariamente alterados, en una extensión de 40-50 kilómetros. El rango altitudinal al que se colectó las muestras fue desde los 866 hasta los 1978 msnm, y el rango de ubicación fue desde $0,31327^{\circ}\text{S } 78,93134^{\circ}\text{O}$ hasta $0,23759^{\circ}\text{S } 78,81492^{\circ}\text{O}$.

(5) Cotopaxi: debido a la poca cantidad de muestras con las que se trabajó, se decidió agrupar a muestras provenientes de la localidad Sarapullo con muestras provenientes de la localidad de Sigchos. La ubicación aproximada de Sarapullo y Sigchos es $0,48523^{\circ}\text{S } 78,98992^{\circ}\text{O}$. Las muestras fueron colectadas a una altitud entre los 1800 y los 2000 msnm.

4.1.3. IDENTIFICACIÓN Y COLECCIÓN DE MUESTRAS.

P. acuminata es una palmera de fácil identificación en el campo. Su tamaño mediano, la forma y tamaño de sus hojas e inflorescencias, y el color rojizo de su filóscapo (crownshaft) son características que permiten diferenciarla de otras palmeras con las que convive como algunas del género *Chamaedorea* Willd. (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995).

Se colectó individuos adultos con el objetivo de evitar sesgos en la estructura genética temporal entre generaciones. Para coleccionar las muestras se usó el mismo criterio sin importar si la colección se realizó a lo largo de una vía o dentro de parches de vegetación, o bosques. Cada vez que un palmito adulto era identificado, se lo colectaba, pero se optó por ignorar otros individuos ubicados alrededor con la finalidad de evitar utilizar individuos emparentados, y se siguió colectando individuos más alejados. El tejido vegetal se lo obtuvo de la estípula (hoja joven) y se secó con sílica gel.

4.2. EXTRACCIÓN DE ADN.

Una vez que las muestras estaban completamente secas, se las ingresó a la base de datos del Laboratorio de Ecología Molecular de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE (laboratorio 113) con todos los datos de colección.

Se tomó una pequeña muestra de tejido seco de cada individuo y se la trituró de forma manual con un mortero y un pistilo. El tejido triturado (aproximadamente 0,1gr) fue guardado en tubos con tapa de 1,5ml para la posterior extracción de ADN siguiendo las instrucciones del kit *PureLink™ Genomic Plant DNA Purification* de Invitrogen (Anexo 1).

Para la visualización y cuantificación del ADN obtenido, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 5% (Anexo 2) y una escalera *Low Mass* de Invitrogen (Figura 3). Se utilizó 3ml de ADN y la misma cantidad de buffer de carga (formamida al 98%) que permite que la muestra caiga dentro del pocillo.

4.3. OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES COMO MARCADORES MOLECULARES.

4.3.1. PRUEBAS DE TRANSFERIBILIDAD.

Debido a que no existen microsátélites diseñados para *P. acuminata*, y aprovechando la característica de los microsátélites de poseer compatibilidad cruzada, se probó primers de tres especies de palmeras filogenéticamente cercanas a *P. acuminata* (Dransfield et al., 2005): *Euterpe edulis* (Gaiotto et al., 2005), *Oenocarpus bataua* (Montúfar et al., 2006) y *Oenocarpus bacaba* (Lepsch-Cunha et al., 2003).

Se amplificó todos los primers disponibles (Tabla 1) bajo las mismas condiciones PCR descritas por los autores, y se los corrió en geles de agarosa similares a los utilizados para visualizar la calidad del ADN. Se escogió los marcadores que presentaban bandas dentro del rango esperado en pares de bases (100-300 pares de bases, dependiendo del primer). La medición se la realizó con ayuda de la escalera molecular (Figura 4).

Se corrió los marcadores positivos en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% y urea 5M acompañados de una escalera *10bp*. Para visualizar los fragmentos se realizó una tinción a

base de nitrato de plata. Los geles de poliacrilamida, la electroforesis y la tinción se realizaron siguiendo las instrucciones del kit de secuenciamiento de Promega (Anexo 3).

4.3.2. ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS PCR.

Debido a que los microsatélites son marcadores codominantes, y *P. acuminata* es un organismo diploide, en los geles de poliacrilamida se observó un máximo de dos bandas por locus en cada muestra (Figura 5). Se seleccionó a los primers que presentaban polimorfismo, es decir varios alelos por locus. En los primers que se observó más de dos bandas o bandas con baja intensidad, se elevó la temperatura de anillamiento de la PCR para mejorar la especificidad del primer, o se probó con varias concentraciones de magnesio en el mix de PCR ya que éste actúa como cofactor de la polimerasa. Se realizó varias pruebas y varias corridas en geles de poliacrilamida hasta obtener un número total de seis primers polimórficos.

4.3.3. OBTENCIÓN, MEDICIÓN Y TABULACIÓN DE DATOS.

Se realizó reacciones PCR de cada primer polimórfico obtenido con todas las muestras de ADN, siguiendo el protocolo PCR determinado para cada primer.

Una vez realizados los geles, se marcó las bandas correspondientes a cada alelo y se midió la distancia recorrida desde el frente de migración (lugar donde se cargan las muestras, y desde donde empiezan a migrar por el gel) con ayuda de una regla. También se marcó las bandas de la escalera y se midió la distancia que habían recorrido. Se realizó un gráfico de dispersión entre la distancia migrada por cada banda de la escalera y su correspondiente peso molecular

(en pares de bases). Con ayuda de este gráfico se obtuvo la ecuación de la recta ($a = mX + b$), y se reemplazó la distancia migrada de cada alelo en “X”.

Con los datos obtenidos se realizó una matriz en el programa GenAlEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2005) con los tamaños de alelos de todas las muestras en cada uno de los locus. Se seleccionó este programa debido a que permite la conversión de datos a los programas GenePop 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995a) y Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Se realizó análisis de desequilibrio ligado, de diversidad y de diferenciación genética con los programas GenePop 4.0.10 (Raymond & Rousset, 1995a) disponible en la página web <http://genepop.curtin.edu.au/>, GenAlEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2005), Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), SPADE (Chao & Shen, 2010), e Isolation by Distance Web Service 3.16 (Jensen *et al.*, 2005) disponible en la página <http://ibdws.sdsu.edu/~ibdws/>.

4.4.1. DESEQUILIBRIO LIGADO.

Se realizó un análisis de desequilibrio ligado para comprobar si los diferentes loci se encuentran asociados independientemente entre sí o no. La prueba consiste en una asociación entre pares de loci diploides, descrito como una prueba de desequilibrio ligado compuesto (Weir, 1996). Se crean tablas de contingencia para cada par de loci, y luego se calcula una prueba G (estadístico de relación de probabilidad del logaritmo) para cada tabla usando el algoritmo de cadena de Markov (Raymond & Rousset, 1995b).

Para la realización de este análisis se utilizó el programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995a) comprobando cada par de loci en cada población usando el estadístico de relación de probabilidad del logaritmo, con los valores *default* de los parámetros de la cadena Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000).

4.4.2. EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.

El Equilibrio Hardy-Weinberg es un concepto central en muchos modelos de diversidad y diferenciación genética. Dadas las frecuencias alélicas iniciales en una población, el equilibrio Hardy-Weinberg permite predecir la proporción de genotipos diploides en la siguiente generación bajo panmixia (apareamiento al azar; Lowe *et al.*, 2004). Las condiciones que debe seguir una población para mantener este equilibrio son: que exista panmixia (apareamiento al azar entre todos los individuos de una población), que no exista ningún tipo de selección (ni sexual ni natural), migración o mutación, que el tamaño de la población sea efectivamente infinito y que los alelos se segreguen siguiendo leyes de herencia mendelianas (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Se utilizó el programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995a) para calcular el equilibrio Hardy-Weinberg mediante una prueba de probabilidad conocida como “la prueba exacta Hardy-Weinberg” (Haldane, 1954). En esta prueba, la probabilidad de las muestras observadas es utilizada para definir la zona de rechazo, y los valores p corresponden a la suma de las probabilidades de todas las tablas con la misma probabilidad. El programa, al identificar más de seis alelos, automáticamente utilizó el algoritmo de cadena de Markov para estimar el valor exacto de los valores P sin ningún tipo de sesgo (Guo & Thompson, 1992). Se utilizó los

valores *default* de los parámetros de la cadena Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000). El programa calculó automáticamente un test global (Método de Fisher) para conocer los valores globales Hardy-Weinberg de cada población.

4.4.3. DIVERSIDAD GENÉTICA.

Con el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) se calculó la diversidad alélica y la heterocigosidad observada y esperada. Una de las fórmulas más sencillas de calcular la diversidad genética en poblaciones es la diversidad alélica (A), que es simplemente el número promedio de alelos por locus. Este método es sensible al tamaño de muestra y variará de acuerdo al número de individuos muestreados (Freeland, 2005). También dependiente del tamaño de muestra, es la heterocigosidad observada (H_o) que es calculada al dividir el número de heterocigotos en un locus en particular por el número total de individuos muestreados (Freeland, 2005). La heterocigosidad esperada (H_e), conocida también como diversidad génica (h ; Nei, 1987), se define como la probabilidad que dos haplotipos al azar sean diferentes dentro de la muestra. Esta es una prueba menos sensible al tamaño de la muestra (Freeland, 2005) y se calcula de la siguiente manera:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

donde n es el número de las copias génicas en la muestra, k es el número de haplotipos, y p_i es la frecuencia de la muestra del i -ésimo haplotipo.

Con el programa GenePop (Raymond & Rousset, 1995a) se calculó el coeficiente de endogamia (F_{IS}). Este coeficiente es parte de los *F-statistics* desarrollados por Wright (1951), y describe la divergencia de la heterocigosidad observada dentro de las poblaciones con la de la población total asumiendo panmixia (Lowe *et al.*, 2004). Esto refleja la probabilidad de que dos alelos dentro de un mismo individuo sean idénticos por descendencia, y se calcula de la siguiente manera:

$$F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$$

donde H_I es la heterocigosidad observada de una población en el momento de la investigación, y H_S es la heterocigosidad que podría esperarse si la población estuviera en equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005). El programa calculó un análisis global del *Fis* basado en Weir & Cockerham (1984)

Con el programa GenAlEx 6.0 (Peakall & Smouse, 2005) se calculó el número de alelos únicos por población.

4.4.4. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.

Para calcular la diferenciación genética entre las poblaciones se utilizó el índice de diferenciación D propuesto por Jost (2008), debido a que Jost sostiene que los índices G_{ST} y sus relativos (entre ellos los F_{ST} , R_{ST} , etc) no son índices válidos para calcular la diferenciación genética entre poblaciones con valores cercanos a 0 supuestamente cuando las poblaciones se encuentran diferenciadas (Jost, 2008). Jost en su trabajo (2008) comprueba matemáticamente que los índices G_{ST} pueden dar valores cercanos a cero cuando la diversidad genética es alta,

aunque las poblaciones se encuentren completamente diferenciadas. Actualmente existe un debate sobre este índice y si debería reemplazar a los índices G_{ST} para calcular la diferenciación genética entre poblaciones. Existen trabajos en los cuales se comprueba y se recomienda usar el índice de diferenciación D como una verdadera medida de diferenciación (Gerlach *et al.*, 2010; Heller & Siegismund, 2009; Jost, 2009) y otros en los que se defiende el uso de índices como el F_{ST} , R_{ST} o G_{ST} (Ryman & Leimar, 2011; Whitlock, 2011)

El índice D puede ser calculado de la siguiente manera:

$$D = [(H_T - H_S)/(1 - H_S)] [n/(n - 1)]$$

donde H_t es la heterocigosidad total, H_s es la heterocigosidad media de cada población, y n es el número de poblaciones (Jost; 2008). Se utilizó el programa SPADE (Chao & Shen, 2010), con una significación de 0,05.

Adicionalmente se utilizó el estadístico “clásico” F_{ST} con la finalidad de comparar los resultados. El F_{ST} es un índice de fijación de alelos propuesto por Wright (1951) como parte de los estadísticos- F , y es uno de los métodos más comunes utilizados para calcular la diferenciación genética entre poblaciones. El F_{ST} describe la reducción de la heterocigosidad dentro de una población, con respecto a la población total, debido a selección o deriva (Lowe *et al.*, 2004). Se calcula de la siguiente manera:

$$F_{ST} = (H_T - H_S)/H_T$$

donde H_t es la heterocigosidad esperada del total de las poblaciones, y H_s es la heterocigosidad que se podría esperar si la población está en equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005). Para el cálculo del F_{ST} entre poblaciones se utilizó el programa Arlequin

(Excoffier *et al.*, 2005), con 1000 permutaciones y los valores p fueron calculados con una significación de 0,05.

Adicionalmente se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) con las matrices de D y de F_{ST} en el programa GenAlEx (Peakall & Smouse, 2005). Un PCA es análisis multivariado que nos permite reducir las dimensiones de un set de datos, preservando la mayor cantidad de información posible. Mediante este análisis, los datos se transforman en un sistema de coordenadas (los componentes principales) que son funciones lineales de las variables originales (Jolliffe, 2002).

4.4.5. ANÁLISIS DE VARIANCIAS MOLECULARES (AMOVA).

Se realizó un AMOVA en el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005), cuya finalidad es calcular la variación molecular a varios niveles dentro de una especie utilizando datos moleculares. Para la realización del AMOVA se agrupó las poblaciones en dos grupos de acuerdo a su posición con respecto a los Andes, el primer grupo con occidentales (Nanegalito, Chiriboga, Pahuma, Mindo y Cotopaxi) y el segundo con las poblaciones orientales (Baeza-carretera, Baeza-antenas, Cosanga, El Chaco y Borja). El AMOVA y los niveles de significación se calcularon con 1000 permutaciones. Adicionalmente se calculó un AMOVA solo con las poblaciones occidentales y otro solo con las poblaciones orientales con la finalidad de calcular el porcentaje de variación entre poblaciones dentro de cada región.

4.4.6. AISLAMIENTO POR DISTANCIA.

Se realizó un test de aislamiento por distancia para determinar si existe una relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas. Se utilizó el programa Isolation By Distance Web Service con 30000 randomizaciones, y las matrices utilizadas fueron la de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008), y una de distancias geográficas entre pares de poblaciones obtenida con el programa Google Earth disponible en la página <http://www.google.es/intl/es/earth/index.html>. Se utilizó una prueba de Mantel para probar la significación estadística al 5%. Adicionalmente se realizó un análisis de aislamiento por distancia entre poblaciones occidentales, y otro análisis solo para poblaciones orientales.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE ADN.

Después de realizar el muestreo, se obtuvo un total de 228 muestras en las localidades de Nanegalito (27), Chiriboga (38), Pahuma (20), Mindo (30), Cotopaxi (12), El Chaco (18), Cosanga (18), Borja (22), Baeza-antenas (21) y Baeza-carretera (22).

La extracción de ADN fue exitosa utilizando el kit de extracción de Promega. Se cuantificó la cantidad de ADN de la solución B (debido a que esta solución de ADN es la utilizada para las amplificaciones PCR) y se obtuvo un valor promedio de 3.3ng/ml. Se observó que el ADN estaba, en la mayoría de casos, degradado pero no fue inconveniente para realizar las amplificaciones PCR debido a que los microsatélites al ser regiones cortas dentro del genoma, difícilmente son afectados por la degradación.

5.2. OBTENCIÓN DE DATOS.

Se utilizó un total de 41 primers disponibles, bajo los protocolos descritos en Gaiotto *et al.* (2005), Montúfar *et al.* (2006) y en Lepsch-Cunha *et al.* (2003), de los cuales 18 amplificaron en *P. acuminata* (Tabla 1). Se modificó los protocolos PCR, en caso de ser necesario, a los 18 primers que amplificaron en *P. acuminata* y se obtuvo un total de 6 primers polimórficos y de fácil lectura que son: Ob01, Ob17, Ob19, AG5-5#6, AG5-7#9 y AG5-5#1 (Tabla 2).

5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

5.3.1. DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.

Con una significación de 0.05 se encontró algunos pares de loci en desequilibrio ligado en cada población. En la población de Nanegalito se encontró un par de loci en desequilibrio ligado que fueron Ob01 y AG5-5#6. En Cotopaxi el par de loci Ob01 y AG5-7#9 se encontraron en desequilibrio ligado. En El Chaco se encontró 6 pares de loci en desequilibrio ligado que fueron Ob01 y Ob17, Ob01 y AG5-5#6, Ob17 y AG5-5#6, Ob01 y AG5-7#9, Ob17 y AG5-7#9, y AG5-5#6 y AG5-7#9. En Cosanga se encontró un par de loci que fueron Ob19 y AG5-7#9. En Baeza (antenas) y Baeza (carretera) se encontró un par de loci en desequilibrio ligado en cada población, siendo AG5-5#6 y AG5-7#9, y Ob17 y AG5-5#6 respectivamente. El programa no realizó tablas de contingencia del loci AG5-5#1 en las poblaciones de Cotopaxi, Baeza (antenas) y Baeza (carretera) debido a su naturaleza monomórfica dentro de dichas poblaciones. Tampoco se realizó tablas de contingencia del loci Ob19 en la población de Baeza (carretera) por el mismo motivo. En Chiriboga, Pahuma, Mindo y Borja no se encontró ningún par de loci en desequilibrio ligado. El programa también entregó un test global (Método de Fisher) para cada par de loci con todas las muestras. Se obtuvo como resultado que el par de loci Ob01 y AG5-5#6 están en desequilibrio ligado con un valor significativo, y de la misma manera los pares de loci Ob01 y AG5-7#9, y Ob17 y AG5-7#9 dieron un valor altamente significativo cuyos valores no fueron entregados por el programa (Tabla 3).

El análisis global (Test de Fisher) del equilibrio Hardy-Weinberg dio valores con los que se pudo comprobar que ninguna de las poblaciones se encuentra bajo equilibrio Hardy-Weinberg,

ya que todas presentaron valores altamente significativos. Con una significación de 0.05, se encontró que un locus no se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg en la población Cosanga (AG5-7#9); dos en Pahuma (Ob01 y Ob19), Cotopaxi (Ob01 y AG5-7#9), El Chaco (Ob01 y Ob17), Borja (AG5-5#6 y AG5-7#9), Baeza (antenas; Ob17 y AG5-7#9) y Baeza (carretera; Ob17 y AG5-7#9); tres en Nanegalito (Ob01, AG5-5#6 y AG5-7#9) y Mindo (AG5-5#6, AG5-7#9 y AG5-5#1); y cinco en Chiriboga (Ob01, Ob17, AG5-5#6, AG5-7#9 y AG5-5#1). No se calculó valores para el locus AG5-5#1 en Cotopaxi, El Chaco, Baeza (antenas) y Baeza (carretera); y tampoco para el locus Ob19 en Baeza (carretera), debido a la naturaleza monomórfica de estos locus en las poblaciones mencionadas.

A nivel de locus, Ob19 fue el único que se encontró bajo equilibrio Hardy-Weinberg.

5.3.2. DIVERSIDAD GENÉTICA.

El número promedio de alelos por locus varió desde 4.7 alelos en Baeza (carretera) hasta 7.1 alelos en Nanegalito. En todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue menor a la heterocigosidad esperada. Solo tres poblaciones presentaron un alelo único cada una: Nanegalito (AG5-5#6), Pahuma (AG5-5#6) y Cosanga (AG5-7#9). Los valores *F_{is}* variaron desde 0,0343 en Baeza (vía) hasta 0,3714 en Chiriboga (Tabla 4).

5.3.3. DIFERENCIACIÓN y VARIACIÓN GENÉTICA.

Se obtuvo una matriz de datos entre poblaciones, utilizando el nuevo índice de diferenciación *D* con una significación de 0.05. Los valores variaron desde -0.001 entre las poblaciones de El

Chaco y Borja, hasta 0.293 entre las poblaciones de Nanegalito y El Chaco. El valor entre Mindo y Pahuma fue de -0.05, sin embargo Jost (2008) recomienda utilizar los valores negativos como 0 en las matrices de datos. Los valores D fueron en promedio mayores a los valores F_{ST} y R_{ST} , pero la cantidad de datos con significación estadística fueron menores (Tabla 5). En el PCA obtenido con la matriz de D , se observó una variación del 57.61% en el primer eje y del 19.96 en el segundo eje. La figura 7 muestra que todas las poblaciones occidentales se encuentran cercanamente agrupadas entre sí. También se observó que las poblaciones orientales se encuentran separadas del grupo del occidente por el primer eje, a excepción de Cosanga. Las poblaciones del este se encuentran separadas entre sí, ya que El Chaco y Borja se encuentran formando un grupo, y Baeza (carretera) y Baeza (antenas) se encuentran formando otro grupo separado del anterior por el segundo eje.

Al calcular el F_{ST} se obtuvieron valores entre poblaciones y también los valores de significación P . Los valores del F_{ST} variaron desde 0 entre las poblaciones de Pahuma y Mindo, hasta 0.163 entre Cotopaxi y Borja. Pese a que los valores F_{ST} fueron bajos, la mayoría mostró una significación estadística (Tabla 6). El PCA realizado con los valores F_{ST} mostró un 50.24% de variación en el primer eje y 18.46% en el segundo eje y las poblaciones tuvieron una distribución en el gráfico muy similar al obtenido con el estadístico D (Figura 8).

Al calcular el AMOVA, se obtuvo 5.98% de variación entre regiones (oriente y occidente), 4.72% entre poblaciones y 89.29% dentro de las poblaciones (Tabla 7). Todos los porcentajes de variación resultaron altamente significativos. En el AMOVA de las poblaciones occidentales se obtuvo 3.16% de variación entre poblaciones y 96.84% dentro de las poblaciones, siendo significativo únicamente el porcentaje de variación entre poblaciones (Tabla 8). El AMOVA solo entre poblaciones orientales dio un porcentaje de variación entre

poblaciones de 7.68%, y dentro de las poblaciones de 92.32%, siendo significativo únicamente el porcentaje de variación entre poblaciones (Tabla 9).

El análisis de aislamiento por la distancia dio como resultado un gráfico de regresión lineal entre las distancias geográficas y genéticas, donde se observa una clara correlación entre estas distancias. En el gráfico se observó un incremento en los patrones de las distancias genéticas y las distancias geográficas aumentaban, con un valor r de 0,6698 y un valor de significación estadística p de 0.003** (Figura 8). Los análisis de aislamiento por distancia realizados solo a poblaciones del oeste y este por separado, mostraron un incremento en las distancias genéticas a medida que aumentan las distancias geográficas, sin embargo no se obtuvo significación estadística en el análisis con las poblaciones del este. En el análisis realizado en las poblaciones occidentales, se obtuvo un gráfico con un valor r de 0.7294 y un valor p de 0.04* (Figura 9). En el análisis de las poblaciones orientales se obtuvo un gráfico con un valor r de 0.3861 y un valor p de 0.15 (Figura 10)

6. DISCUSIÓN

6.1. USO DE MARCADORES MOLECULARES.

La transferibilidad de microsatélites disponibles de *Euterpe edulis*, *Oenocarpus bataua* y *Oenocarpus bacaba* a *Prestoea acuminata* fue exitosa (43.9% de los primers disponibles), y de éstos se obtuvo varios loci polimórficos (14.63% de los primers disponibles). Estos valores son menores a los reportados por Barbará *et al.* (2007) para transferencia de microsatélites a nivel de géneros. En dicho estudio el porcentaje de microsatélites transferidos con éxito es del 60%, y el de microsatélites polimórficos es del 43%. Más cercanos a los valores obtenidos, son los de transferencia entre especies de monocotiledóneas que son del 58%, y del 27% de transferencia de microsatélites polimórficos. Una de las causas para que los porcentajes de transferibilidad de microsatélites sean menores a los esperados, puede ser mutaciones en las zonas de anillamiento de los primers (zonas flanqueantes de los microsatélites) entre las diferentes especies, por lo que los primers no pueden hibridar con los templados de ADN y no es posible una transferibilidad cruzada. Esto se evidenció en los primers utilizados de *Euterpe edulis*, ya que de los 14 probados solo amplificaron 3, pero con un patrón de bandas difuso. Se observa que los porcentajes de transferibilidad obtenidos no se alejan tanto de los valores de Bárbara (2007) como los porcentajes de primers polimórficos. Esto se debe probablemente a que los primers con transferibilidad positiva no utilizados, fueron descartados no solo por su naturaleza monomórfica, sino también por su difícil lectura lo que redujo el porcentaje de primers polimórficos utilizados. En términos generales podemos ver que la transferibilidad de primers a *P. acuminata* fue exitosa.

6.2. ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Prestoea acuminata*.

Varios pares de loci se encuentran ligados dentro de las diferentes poblaciones, y esto se observa principalmente cuando ha existido deriva, reducción de tamaño poblacional (cuellos de botella, endogamia) o una mezcla reciente de poblaciones debido a que no ha existido el tiempo suficiente para que los loci se clasifiquen independientemente (Beebee & Rowe, 2008; Lowe *et al.*, 2004). El Chaco presentó la mayor cantidad de pares de loci en desequilibrio ligado (seis), y esto podría ser explicado por el bajo número de individuos colectados (18) debido a que está zona se encuentra altamente deforestada y con individuos relictuales. Sin embargo el coeficiente de endogamia de esta población fue moderado ($F_{IS}=0.1528$).

El hecho de que varios pares de loci se encuentren ligados, podría explicar en parte que las poblaciones no se encuentren bajo equilibrio Hardy-Weinberg. Una de las condiciones para que las poblaciones se encuentren en equilibrio es que los loci sigan leyes de herencia mendeliana, pero al estar ligados y no segregarse independientemente, rompen el equilibrio (Freeland, 2005). Sin embargo existen poblaciones que no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg y no poseen pares de loci en desequilibrio ligado, por lo que migración, deriva génica u otros motivos podrían estar rompiendo el equilibrio.

En cuanto a la diversidad genética, se observó que la diversidad alélica (A) es en promedio mayor en las poblaciones occidentales (A=6.62), en comparación con las poblaciones orientales (A=5.32). El mismo patrón se observó al comparar los promedios de los valores de heterocigosidad observada (0.50 en el occidente frente a 0.48 en el oriente) y heterocigosidad esperada (0.64 en el occidente frente a 0.54 en el oriente). El occidente presenta mayor diversidad genética en comparación con el oriente. Una de los motivos para explicar esto

podría ser que en el occidente aún existen gran cantidad de bosques inalterados, pese a la explotación de palmito en los 80's, a diferencia del oriente donde la mayoría de bosques donde se realizó la recolección de muestras han tenido un impacto antropogénico fuerte. También el occidente presenta dos alelos únicos, en comparación a un alelo único en el oriente, por lo que se observa que las poblaciones del occidente tienen una diversidad genética ligeramente mayor a las del oriente de los Andes.

También se observó que todas las poblaciones presentan cierto nivel de endogamia, al presentar valores positivos de F_{is} , siendo Chiriboga la población que presenta el valor más alto (0.37). Se observa que ninguna de las poblaciones se encuentra bajo depresión endogámica debido a que Chiriboga, pese a tener el valor más alto de F_{is} , no presenta ningún par de loci en desequilibrio ligado. Por otro lado, El Chaco presenta el mayor número de pares de loci en desequilibrio ligado (6), pero su valor de F_{is} es moderado (0.15).

La matriz de diferenciación genética obtenida con el estadístico D , muestra una clara diferenciación entre las poblaciones del occidente contra las poblaciones del oriente de los Andes. Las poblaciones de Nanegalito, Chiriboga y Pahuma presentan valores de diferenciación significativos al compararlos con cada una de las poblaciones del oriente, y valores bajos y sin significación estadística al compararlas con cada una de las poblaciones del occidente. De la misma manera se comportan Mindo y Cotopaxi, con la diferencia que no existe una significación estadística al comparar estas dos poblaciones con Cosanga, pese a estar al otro lado de la cordillera, lo que se ve reflejado en el PCA (Figura 6). Mindo con Pahuma y El Chaco con Borja presentan valores negativos interpretados como 0, lo que sugiere que existe poca diferenciación genética entre estos pares de poblaciones.

Se observa que no existe diferenciación entre las poblaciones del occidente entre sí, pero si existe una diferenciación con las poblaciones del oriente. Esto se observa en el PCA debido a que Nanegalito, Chiriboga, Pahuma, Mindo y Cotopaxi forman un grupo unido como se observa en la figura 6. Una posible explicación para que Cosanga no se encuentre diferenciada de Mindo y Cotopaxi podría ser una intervención antropogénica relativamente reciente, debido a que Mindo y Cotopaxi se encuentran alejadas entre sí por la población de Chiriboga, pero esta última si se encuentra diferenciada de Cosanga. Morcote-Ríos & Bernal (2001) proponen que varias especies de palmeras americanas deben su actual distribución a la intervención antropogénica. Al ser una especie con un palmito comestible, probablemente la estructura genética de *P. acuminata* también haya sido influenciada por el hombre, específicamente en Cosanga donde se observa una cierta similitud genética con el occidente.

Entre las poblaciones orientales se observa lo contrario debido a que existe diferenciación entre poblaciones. La población de Cosanga presenta valores significativos de diferenciación con El Chaco, Borja y Baeza (carretera), por lo que está genéticamente diferenciada de la mayoría de las poblaciones que la rodean. También se observa que la población de Baeza (antenas) se encuentra diferenciada de El Chaco y Borja, probablemente debido a (a) su mayor altitud con respecto a estas poblaciones (cerca de 2000 msnm), y (b) a que se encuentra rodeada de pastizales y que es un remanente pequeño de vegetación (por ende presenta un valor de endogamia de 0.23 que es el más alto para este lado de la cordillera). Baeza (antenas) no presenta diferenciación genética significativa con Cosanga, y podría explicarse a que en esta localidad también se colectaron muestras sobre los 2000 msnm. La existencia del valle del río Quijos entre El Chaco y Borja podría explicar el valor negativo de D , debido a que el valle permitiría que exista flujo génico entre estas dos poblaciones. La ausencia de equilibrio

Hardy-Weinberg puede explicarse, no solo por la presencia de desequilibrio ligado, sino también por la migración ocurrida entre poblaciones que ha homogenizado genéticamente (no en la misma medida) a poblaciones dentro de su respectiva región.

Se ha observado que en el Ecuador, el occidente de los Andes presenta un mayor nivel de endemismo que el oriente a nivel de plantas (Balslev, 1988), y el endemismo suele explicarse debido a un bajo nivel de variabilidad genética y aislamiento de las poblaciones (Baskin & Baskin, 1988). Se observa que las poblaciones occidentales no se encuentran genéticamente aisladas entre sí debido a que a pesar de las transformaciones de los bosques, se mantienen rutas para el flujo génico lo que no favorece a la diferenciación genética. Podemos observar que los resultados de diversidad obtenidos son contrarios a lo esperado debido a que el occidente tiene mayor diversidad que el oriente, y bajo los resultados de Balslev (1988) se esperaría lo contrario. Una posible causa para explicar una menor diversidad en el oriente es la deforestación evidenciada de los bosques, sin embargo al revisar un mapa de vegetación remanente del Ecuador (Universidad Andina Simón Bolívar, disponible en la página <http://www.campusvirtual.uasb.edu.ec/uisa/images/mapasec/vegetacion%20remanente.pdf>) se observa que los bosques donde se colectaron las muestras, tanto al oriente como al occidente, se encuentran relativamente conservados. La deforestación podría no ser la única razón para explicar los resultados obtenidos, sino también a la dispersión de *P. acuminata*, que se presume se realiza por aves que transportan semillas por largas distancias, y han contribuido a que no exista un aislamiento de las poblaciones occidentales.

Al utilizar una matriz con valores F_{st} se observa que la mayoría de poblaciones se encuentran diferenciadas entre sí, aunque pertenezcan a la misma región con respecto a los Andes. No se observó significación estadística entre las poblaciones de Nanegalito con Pahuma y Mindo (las

tres poblaciones se encuentran cercanas geográficamente). Además entre Mindo y Pahuma hay un valor F_{st} negativo, al igual que con D , lo que corrobora que estas dos poblaciones son genéticamente muy similares. El PCA obtenido (Figura 7) es exactamente igual al graficado con la matriz de D por lo que se observa que, pese a que los valores de D son mayores a los de F_{st} , existe una relación entre los valores proporcionados por los dos estadísticos y la diferencia se encuentra en la significación de los valores.

El valor promedio de diferenciación D entre todas las poblaciones fue de 0.14, mientras que el valor promedio de F_{st} fue de 0.083, es decir el valor de D es un 68.6% mayor al de F_{st} . Según un estudio realizado por Heller & Siegismund (2009), se observó que los valores D son un 60% más altos que los G_{st} y sus relativos (entre ellos el F_{st}), por lo que los valores obtenidos se aproximan a los esperados. Existen otros estudios en los que los estadísticos F_{st} y D han sido comparados, siendo por lo general los valores obtenidos con D mayores (Heller *et al.*, 2010, Lange *et al.*, 2010; Mock *et al.*, 2010; Portnoy *et al.*, 2010; Soto *et al.*, 2010).

6.3. LOS ANDES COMO BARRERA AL FLUJO GÉNICO EN *Prestoea acuminata*.

El porcentaje de variación entre regiones, obtenido con el AMOVA, fue bajo (5,98%) pero significativo por lo que se comprueba que existe variación entre las poblaciones del occidente con las de oriente. El mayor porcentaje de variación se encontró dentro de las poblaciones. Los resultados de los AMOVAs solo en las poblaciones occidentales y en las orientales coinciden con los PCAs (Figura 6 y 7). El AMOVA de las poblaciones occidentales dio un porcentaje de variación bajo entre poblaciones (3.16%), lo que se ve reflejado en el PCA debido a que estas poblaciones forman un grupo relativamente homogéneo debido a la

presencia de flujo génico. En cuanto a las poblaciones orientales, el AMOVA dio un porcentaje mayor de variación entre poblaciones (7.68%) a lo obtenido en el occidente. Este porcentaje de variación mayor entre poblaciones se ve reflejado en el PCA debido a que las poblaciones orientales no forman un grupo homogéneo debido a la alteración del flujo génico.

Se observó que a nivel global, *P. acuminata* presenta aislamiento por la distancia calculado mediante un modelo de estructuración espacial, debido a que las distancias genéticas entre poblaciones aumentan a medida que lo hacen las distancias geográficas. Se puede inferir que la dispersión en *P. acuminata* ha sido eficaz como para mantener un modelo de aislamiento por la distancia, pero no para mantener una estructura genética homogénea entre poblaciones que se encuentran en las estribaciones orientales y occidentales de los Andes.

No existen trabajos sobre la dispersión de semillas de *P. acuminata*, pero la dispersión podría darse por medio de animales que recorran grandes distancias transportando sus semillas. Las semillas de *P. acuminata* son pequeñas, con un diámetro de 1 a 1.8 cm (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995), por lo que pueden ser fácilmente transportadas por aves. Las aves, al tener facilidad para realizar recorridos largos, podrían mantener cierto nivel de flujo génico entre poblaciones al cruzar la cordillera transportando semillas.

Según Frantz *et al.* (2010), el modelo de aislamiento por la distancia asume que todos los individuos se dispersan igualmente en todas las direcciones en un ambiente homogéneo. Si existe alguna barrera que impida una dispersión normal de los individuos, las distancias efectivas entre poblaciones no serán correctas llevando a una desviación del aislamiento por la distancia. Esto se debe a que, en presencia de una barrera geográfica, la distancia genética entre un par de poblaciones sería mayor a lo esperado bajo un modelo de aislamiento por la

distancia. Al no existir una relación entre distancias geográficas y distancias genéticas (debido a barreras de flujo génico), no existiría aislamiento por la distancia, pero *P. acuminata* muestra aislamiento por la distancia a nivel global.

Podría interpretarse que la diferenciación entre las poblaciones del oriente y occidente de los Andes se debe a la distancia que las semillas deben ser dispersadas, y no necesariamente a la ausencia de flujo génico entre las poblaciones causado por una barrera geográfica. Sin embargo los Andes también representan una barrera significativa para las aves.

En un estudio de Brumfield & Capparella (1996) se analizó las distancias genéticas de varias especies de aves, pertenecientes a varias familias, con distribución transandina y en Centroamérica. En dicho estudio se observó que las distancias genéticas entre poblaciones transandinas de aves son el doble que las distancias genéticas entre poblaciones en Centroamérica y la región del Chocó, donde no existe una barrera geográfica visible.

Mediante el uso de secuencias de ADN de mitocondrias que codifican proteínas, Weir (2009) encontró que al menos durante el Pleistoceno los Andes no representaron una barrera para la diferenciación de aves de bosques montanos con distribución transandina, basándose en valores bajos de diferenciación genética (0-5.3%). Weir además encontró que la mayoría de estas poblaciones de aves se aislaron a cada lado de los Andes hace aproximadamente un millón de años. Los ciclos de glaciación del Pleistoceno (2.5 millones de años) fueron lo suficientemente fuertes sólo durante los últimos 0.9 millones de años como para que los Andes se conviertan en una barrera efectiva al flujo génico produciendo la vicariancia de las poblaciones de aves transandinas (Weir, 2009). La cordillera de los Andes es un factor que ha limitado la dispersión de flujo génico en aves con distribución transandina, por lo que la

dispersión de semillas de *P. acuminata* por medio de aves a través de los Andes podría haber sido afectada.

A nivel regional, *P. acuminata* se comporta de la misma manera al realizar un análisis solo con las poblaciones del occidente, pero no se observa este tipo de estructuración espacial entre las poblaciones del oriente de los Andes. La ausencia de aislamiento por la distancia se interpreta comúnmente como la existencia de gran cantidad de flujo génico en grandes distancias (Crispo & Hendry, 2005), sin embargo este no es el caso debido a que las poblaciones del oriente presentan una marcada tendencia hacia una divergencia molecular entre sus poblaciones. El aislamiento por la distancia puede presentarse en especies con gran distribución, como *P. acuminata*, en comparación a su capacidad de dispersión (Bernal *et al.* 2005; Planes & Fauvelot, 2002), pero se observa que en el oriente el flujo génico entre poblaciones es demasiado bajo, lo que no permite que exista una estructuración espacial en esta región.

En *Ceroxylon equinulatum* se observó que el flujo génico entre poblaciones transandinas al norte y centro del Ecuador está muy limitado (Trénel *et al.*, 2008) debido a la presencia de la cordillera de los Andes. Al parecer la cordillera de los Andes representa una barrera efectiva al flujo génico en palmeras, y una potencial explicación para la existencia de aislamiento por la distancia en poblaciones transandinas de *P. acuminata* es que su estructura genética es en parte un remanente del pasado. La Hipótesis de Vicariancia por el Levantamiento de los Andes (Chapman, 1926) sostiene que la distribución de las especies transandinas es el resultado del levantamiento de las cordilleras andinas. Se cree que muchas de las especies de plantas y animales presentes en ambos lados de los Andes, han evolucionado y divergido debido al levantamiento de la cordillera al separar poblaciones (Trénel *et al.*, 2008; Weir,

2009). Según Gregory-Wodzicki (2000), en el Mioceno la cordillera de los Andes tenía un 40% de la altura actual, por lo que las especies podían mantener un flujo génico normal, pero se elevó rápidamente hasta tener su tamaño actual hace aproximadamente 2.7 millones de años en el Pleistoceno. Probablemente *P. acuminata* presentaba un modelo de aislamiento por la distancia antes de que los Andes aparecieran, y en cierta medida se ha conservado hasta la actualidad. El hecho de que la mayoría de alelos estén compartidos entre las diferentes poblaciones entre las regiones y existan pocos alelos únicos (no ha existido gran fijación de alelos por deriva génica) nos indica que las poblaciones mantuvieron flujo génico en el pasado. Sin embargo, el reciente levantamiento de los Andes ha limitado el paso de flujo génico entre poblaciones del este y oeste (demostrado con los valores de diferenciación D), provocando un lento proceso de diferenciación genética entre regiones.

P. acuminata es una especie con un gran potencial económico, por lo que se la ha cosechado a partir de poblaciones naturales en las últimas décadas y esto suele conllevar implicaciones en la estructura genética de la especie. Al conocer varios aspectos sobre la estructura genética de *P. acuminata*, se pueden desarrollar planes de manejo sustentables con el objetivo de aprovechar su potencial económico en un futuro cercano.

En base a los valores de D y al AMOVA, se ve que la cordillera de los Andes representa una barrera efectiva para el flujo génico en *Prestoea acuminata* debido a que se observa una divergencia genética entre las poblaciones del occidente y oriente. También se observa que las poblaciones del occidente (Naengalito, Chiriboga, Pahuma, Mindo y Cotopaxi) forman un grupo homogéneo a nivel genético, pero las del oriente (El Chaco, Cosanga, Borja, Baeza-carretera y Baeza-antenas) no lo hacen debido a motivos desconocidos los cuáles solo son posibles especular. Se recomienda un estudio morfológico con la finalidad de compararlo con

los resultados obtenidos con técnicas moleculares y determinar con exactitud si existe una diferenciación de las poblaciones del este con las del oeste.

7. LITERATURA CITADA

- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. **The estimate of population differentiation with microsatellite markers.** *Molecular Ecology*, 11: 155–4165.
- Balslev, H. 1988. **Distribution patterns of Ecuadorean plant species.** *Taxon*, 37: 567–577.
- Barbará, T, Palma-Silva, C., Paggi, G. M., Bered, F., Fay, M. F., Lexer, C. 2007. **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations.** *Molecular Ecology*, 16: 3759–3767.
- Baskin, J., Baskin, C. 1988. **Endemism in rock outcrop plant communities of unglaciated eastern United States: an evaluation of the roles of the edaphic, genetic and light factors.** *Journal of Biogeography*, 15: 829–840.
- Beebee, T., Rowe, G. 2004. **An introduction to Molecular Ecology, 2nd. Edition.** Oxford University Press Inc., New York, Estados Unidos.
- Bernal, X., Guarnizo, C., Luddecke, H. 2005. **Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes.** *Herpetologica*, 61 (4): 395–408.
- Borchsenius, F., Balslev, H., Pedersen, H. 1998. **Manual to the Palms of Ecuador.** Aarhus University Press, Dinamarca.

- Borchsenius, F., Moraes, M. 2006. **Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae)**. Botánica Económica de los Andes Centrales: 412–433.
- Brower, A. V. Z. 1994. **Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution**. Proceedings of the National Academy of Sciences, 91: 6491–6495.
- Brumfield, R. T., Capparella, A. P. 1996. **Historical diversification on birds in north-western South-America: a molecular perspective on the role of vicariant events**. Evolution, 50 (4): 1607–1624.
- Chao, A., Shen, T.-J. 2010. **Program SPADE (Species Prediction And Diversity Estimation)**. Program and User's Guide published at <http://chao.stat.nthu.edu.tw>.
- Chapman, F. M. 1926. **The distribution of bird-life in Ecuador - a contribution to a study of the origin of Andean bird-life**. Bulletin of the American Museum of Natural History, 55: 1–784.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J., Capparella, A. P. 2005 **Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronata*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity**. Molecular Phylogenetics and Evolution, 36: 338–357.
- Crispo, E., Hendry, A. P. 2005. **Does time since colonization influence isolation by distance? A meta-analysis**. Conservation Genetics, 6: 665–682.

Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M., Lewis, C. 2005. **A new**

Phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. Kew Bulletin, 60 (4): 559–569.

Ervik, F., Feil, J. P. 1997. **Reproductive biology of the monoecious understory palm**

***Prestoea schultzeana* in amazonian Ecuador.** Biotropica, 29 (3): 309–317.

Estrada-Villegas, S., Pérez-Torres, J., Stevenson, P. **Dispersión de semillas por murciélagos**

en un borde de bosque montano. Ecotrópicos, 20 (1): 1–14.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005) **Arlequin ver. 3.0: An integrated software**

package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47–50.

Frantz, A. C., Pope, L. C., Etherington, T. R., Wilson, G. J., Burke, T. **Using isolation-by-**

distance-based approaches to assess the barrier effect of linear landscape elements on badger (*Meles meles*) dispersal. Molecular Ecology, 19: 1663–1674.

Gaiotto, F., Brondani, R., Grattapaglia, D. 2005. **Microsatellite markers for heart of**

palm-*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). Molecular Ecology, 1 (1-2): 86–88.

Gerlack, G., Jueterbock, A., Kraemer, P., Deppermann, J., Harmand, P. 2010. **Calculations of**

population differentiation based on G_{ST} and D : forget G_{ST} but not all of statistics! Molecular Ecology, 19: 3845–3852.

- Gregory-Wodzicki, K. M. 2000. **Uplift history of the Central and Northern Andes: a review.** Geological Society of America Bulletin, 112 (7): 1091–1105.
- Guo, S. W., Thompson, E. A., 1992. **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles.** Biometrics, 48: 361–372.
- Hahn, W. 2002. **A Molecular Phylogenetic Study of the Palmae (Arecaceae) Based on atpB, rbcL, and 18S nrDNA Sequences.** Systematic Biology, 51 (1): 92–112.
- Haldane, J. B. S., 1954. **An exact test for randomness of mating.** Journal of Genetics, 52: 631–635.
- Heller, R., Okello, J. B. A., Siegismund, H. 2010. **Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of Cape buffalo in East Africa.** Molecular Ecology, 19: 1324–1334.
- Heller, R., Siegismund, H. R. 2009. **Relationship between three measures of genetic differentiation G_{ST} , D_{EST} and G'_{ST} : how wrong have we been?** Molecular Ecology, 18: 2080–2083.
- Henderson, A., Galeano, G., Bernal, R. 1995. **Field Guide to the Palms of the Americas,** Princeton University Press, New Jersey, Estados Unidos.
- Hoffmann, F. G., Baker, J. 2003. **Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia: Phyllostomidae*).** Molecular Ecology, 12: 3403–3414.

- Jensen, J. L., Bohonak, A. J., Kelley, S. T. 2005. **Isolation by distance, web service.** Genetics, 6: 13.
- Johnson, D. 1996. **Manejo Sostenible de Asaí (*Euterpe precatoria*) para la Producción de palmito en la Concesión Forestal de Tarumá, Provincia Velasco, Santa Cruz – Bolivia.** Documento técnico, Proyecto BOLFOR.
- Jolliffe, I. T. 2002. **Principal Component Analysis.** Second Edition. Springer-Verlag, New York, Estados Unidos.
- Joseph, L., Moritz, C., Hugall, A. 1995. **Molecular support of vicariance as a source of diversity in rainforest.** Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences, 260: 177–182.
- Jost, L. 2008. **G_{ST} and its relatives do not measure differentiation.** Molecular Ecology, 17: 4015–4026.
- Jost, L. 2009. **D vs. G_{ST} : Response to Heller and Siegmund (2009) and Ryman and Leimar (2009).** Molecular Ecology, 18: 2088–2091.
- Jørgensen, P. M., León-Yáñez, S. 1999. **Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador.** Missouri Botanical Garden Press, Missouri, Estados Unidos.

- Knudsen, H. 1995. **Demography, palm-heart extractivism, and reproductive biology of *P. acuminata* (Arecaceae) in Ecuador.** Tesis de PhD, University of Aarhus, Aarhus, Dinamarca.
- Lange, R., Durka, W., Holzhauer, S. I. J., Wolters, V., Diekötter, D. 2010. **Differential threshold effects of habitat fragmentation on gene flow in two widespread species of bush crickets.** *Molecular Ecology*, 19: 4936–4948.
- Lepsch-Cunha, N., Lund, C. A., Hamilton, M. B. 2003. **Isolation and characterization of nuclear microsatellite loci in the tropical arboreal palm *Oenocarpus bacaba* (Arecaceae).** *Molecular Ecology Notes*, (3): 435–437.
- Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. 2004. **Ecological Genetics: design, analysis and application.** Blackwell Publishing, Estados Unidos.
- Mock, K. E., Brim, J. C., Chong, J. P., Howard, J. K., Nez, D. A., Wolf, D., Gardner, R. S. 2010. **Genetic structuring in the freshwater mussel *Anodonta* corresponds with major hydrologic basins in the western United States.** *Molecular Ecology*, 19: 569–591.
- Montúfar, R., Mariac, C., Pham, J., Pintaud, J. 2006. **Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae).** *Molecular Ecology Notes*, 7 (1): 75–78.

- Morcote-Ríos, G., Bernal, R. 2001. **Remains of palms (Palmae) at archeological sites in the new world: a review.** *The Botanical Review*, 67 (3): 309–350.
- Nei, M., 1987. **Molecular Evolutionary Genetics.** Columbia University Press, New York, Estados Unidos.
- Neigel, J. 2002. **Is F_{ST} obsolete?** *Conservation Genetics*, 3: 167–173.
- Pedersen, H. 1993. **Extractivism in Ecuador with special emphasis on management and economic exploitation of native palms (Arecaceae).** Tesis de Ph.D., University of Aarhus, Aarhus.
- Peña, M. 1996. **Producción de palmito: manejo sostenible de *Euterpe precatoria* (asaí) en la Concesión de Tarumá, Santa Cruz, Bolivia.** Documento técnico, Proyecto BOLFOR.
- Perdices, A., Bermingham, E., Montilla, A., Doadrio, I. 2002. **Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 172–189.
- Planes, S., Fauvelot, C. 2002. **Isolation by distance and vicariance drive genetic structure of a coral reef fish in the Pacific Ocean.** *Evolution*, 56: 378–399.

- Portnoy, D., McDowell, J. R., Heist, E. J., Musick, J. A., Graves, J. E. 2010. **World phylogeography and male-mediated gene flow in the sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus***. *Molecular Ecology*, 19: 1994–2010.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995a. **GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism**. *Journal of Heredity*, 86: 248–249.
- 1995b. **An exact test for population differentiation**. *Evolution*, 49: 1283–1286.
- Roncal, J., Zona, S., Lewis, E. 2008. **Molecular phylogenetic studies of caribbean palms (Arecaceae) and their relationships to biogeography and conservation**. *The Botanical Review*, 74: 78–102.
- Ryman, N., Leimar, O. 2009. **G_{ST} is still a useful measure of genetic differentiation - a comment on Jost's D** . *Molecular Ecology*, 18: 2084–2087.
- Semagn, K., Bjornstad, A., Ndjioudjop, M. N. 2006. **An overview of molecular marker methods for plants**. *African Journal of Biotechnology*, 5 (25): 2540–2568.
- Slatkin, M. 1995. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies**. *Genetics*, 139: 457–462.

Soto, A., Robledo-Arnuncio, J. J., González-Martínez, S. C., Smouses, P. E., Alía, R. 2010.

Climatic niche and neutral genetic diversity of the six Iberian pine species: a retrospective and prospective view. *Molecular Ecology*, 19: 1396–1409.

Svenning, J., Balslev, H. 1998. **The palm flora of the Maquipucuna Montane Forest**

Reserve. *Principes*, 42 (4): 218–226.

Trénel, P., Hansen, M., Normand, S., Borchsenius, F. 2008. **Landscape genetics, historical**

isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm *Ceroxylon equinulatum* (Arecaceae). *Molecular Ecology*, 17: 3528–3540.

Van den Eynden, V., Cueva, E., Cabrera, O. 2004. **Edible Palms of Southern Ecuador.**

Palms, 48 (3): 141–147.

Weigt, L. A., Crawford, A. J., Rand, A. S., Ryan, M. J. 2005. **Biogeography of the túngara**

frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. *Molecular Ecology*, 14: 3857–3876.

Weir, B. S., Cockerham, C. C., 1984. **Estimating *F*-statistics for the analysis of population**

structure. *Evolution*, 38: 1358–1370.

Weir, B. S., 1996. **Genetic Data Analysis II.** Massachusetts, Estados Unidos.

Weir, J. 2009. **Implications of genetic differentiation in neotropical montane forest birds.**

Annals of the Missouri Botanical Garden, 96: 410–433.

Whitlock, M. 2011. **G'_{ST} and D do not replace F_{ST}** . *Molecular Ecology*, 20 (6): 1083–1091.

Wright, S. 1951. **The genetical structure of populations**. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354.

Zamudio, K. R., Greene, H. W. 1997. **Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation**. *Biological Journal of the Linnean Society*, 62: 421–442.

8. FIGURAS

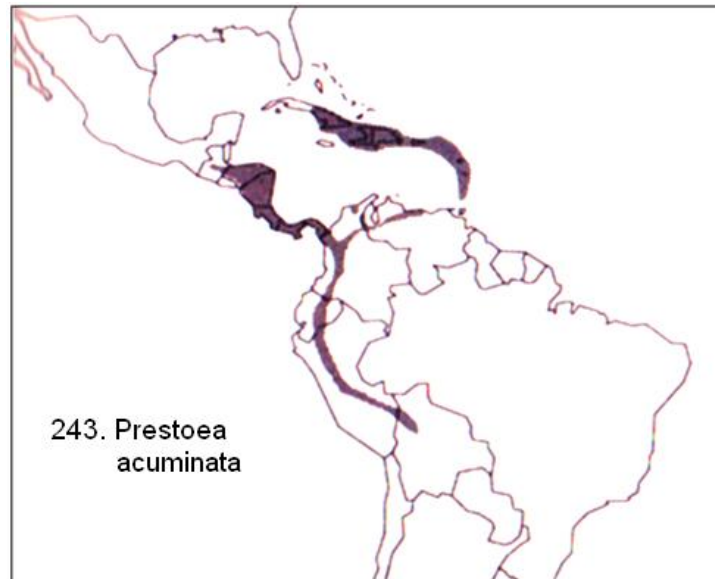


FIGURA 1. Distribución de *Prestoea acuminata* (Henderson *et al.*, 1995).

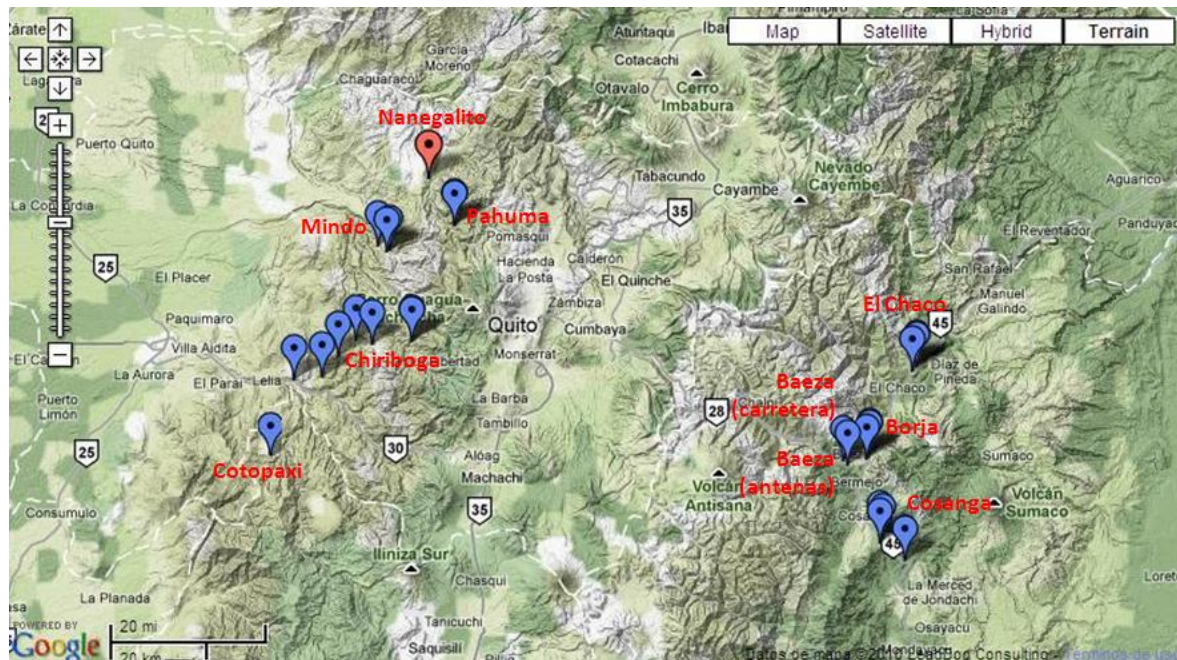


FIGURA 2. Mapa de los lugares donde se colectó muestras de *P. acuminata*.

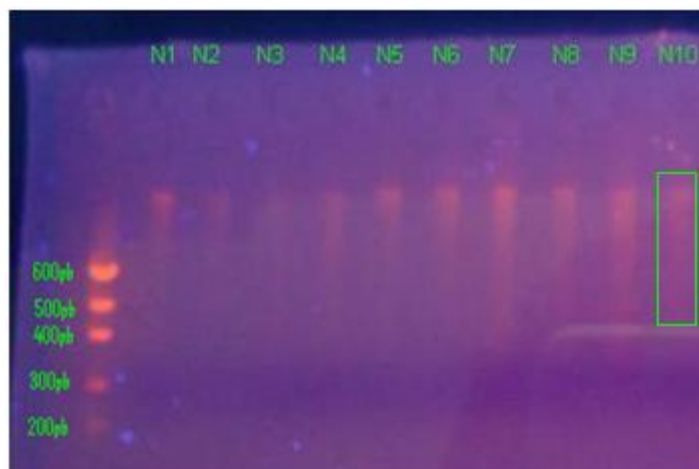


FIGURA 3. Verificación de la calidad y cantidad de la solución B del ADN (enmarcado en N10) obtenido en 10 muestras de la población Nanegalito (N1-N10) de *P. acuminata* visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb).

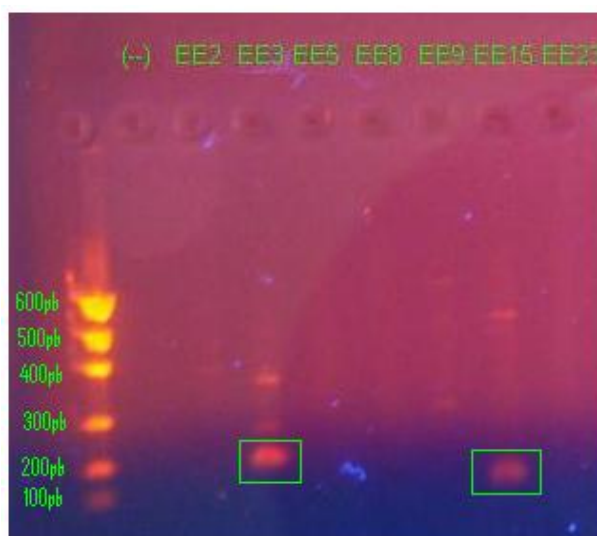


FIGURA 4. Amplificación de primers de *E. edulis* (control negativo, EE2, EE3, EE5, EE8, EE9, EE15 y EE23) en *P. acuminata* con una muestra al azar, visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb). Las bandas pertenecientes a los microsatélites amplificados se observan sobre los 200 pb con el primer EE3, y sobre los 100 pb con el primer EE15 (bandas enmarcadas).

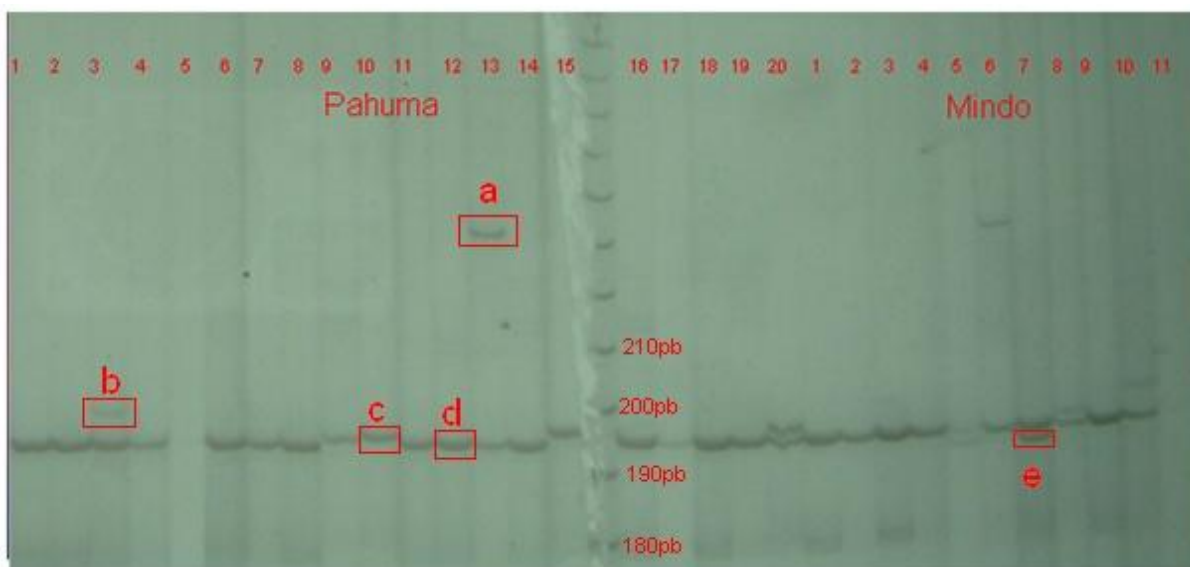


FIGURA 5. Amplificación de muestras de Pahuma (P1-P20) y parte de Mindo (M1-M11) de *P. acuminata* con el primer polimórfico Ob19 visualizado en un gel de poliacrilamida 6% y úrea 5M con una escalera 10bp (bandas cada 10 pb). Se observan los cinco alelos obtenidos (enmarcados) con el primer Ob19 en las 10 poblaciones.

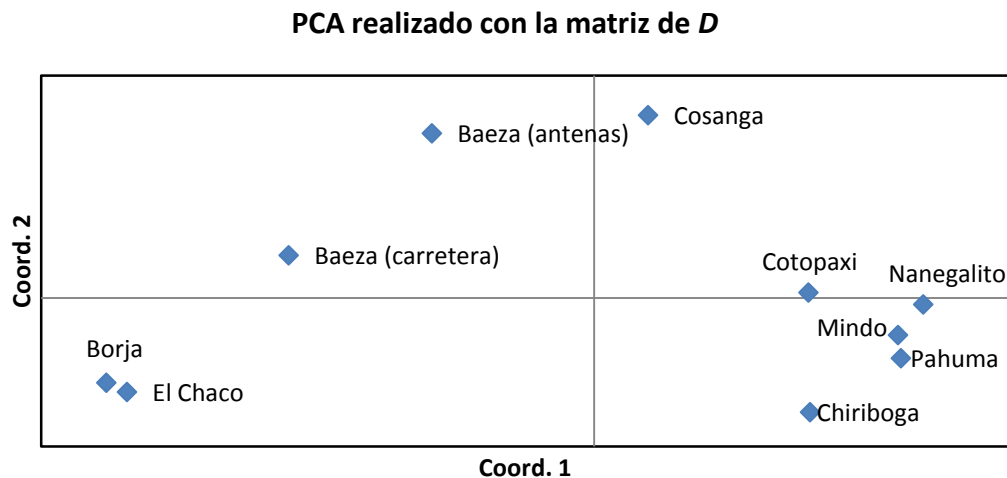


FIGURA 6. PCA realizado con la matriz de D (Jost, 2008) entre 10 poblaciones de *P. acuminata* obtenido con el programa GenAlEx. Las poblaciones del occidente de los Andes son Cotopaxi, Nanegalito, Mindo, Pahuma y Chiriboga; mientras que las poblaciones del oriente de los Andes son Borja, El Chaco, Cosanga, Baeza (carretera) y Baeza (antenas). Porcentaje de variación en el primer eje: 57.61%; porcentaje de variación en el segundo eje: 19.96%.

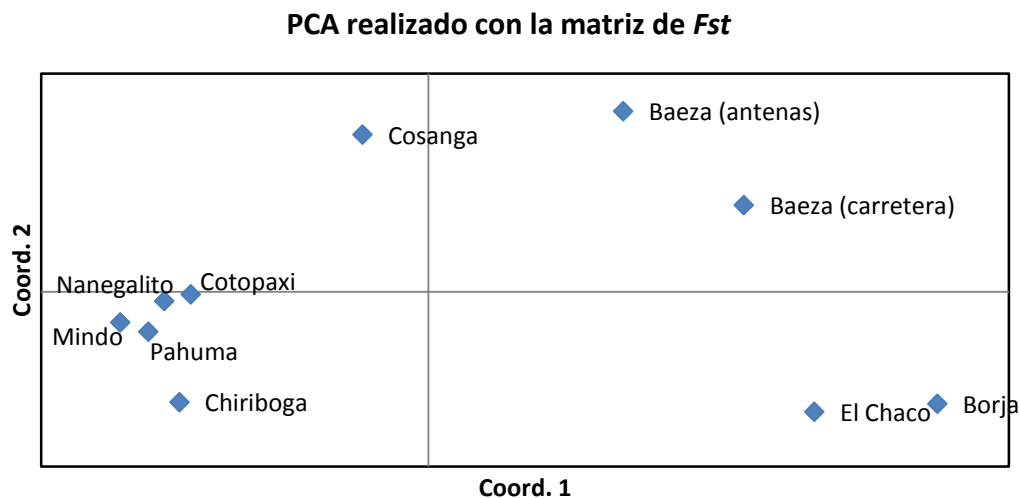


FIGURA 7. PCA realizado con la matriz de F_{ST} entre 10 poblaciones de *P. acuminata* obtenido con el programa GenAlEx. Las poblaciones del occidente de los Andes son Cotopaxi, Nanegalito, Mindo, Pahuma y Chiriboga; mientras que las poblaciones del oriente del los Andes son Borja, El Chaco, Cosanga, Baeza (carretera) y Baeza (antenas). Porcentaje de variación en el primer eje: 50.24%; porcentaje de variación en el segundo eje: 18.46%.

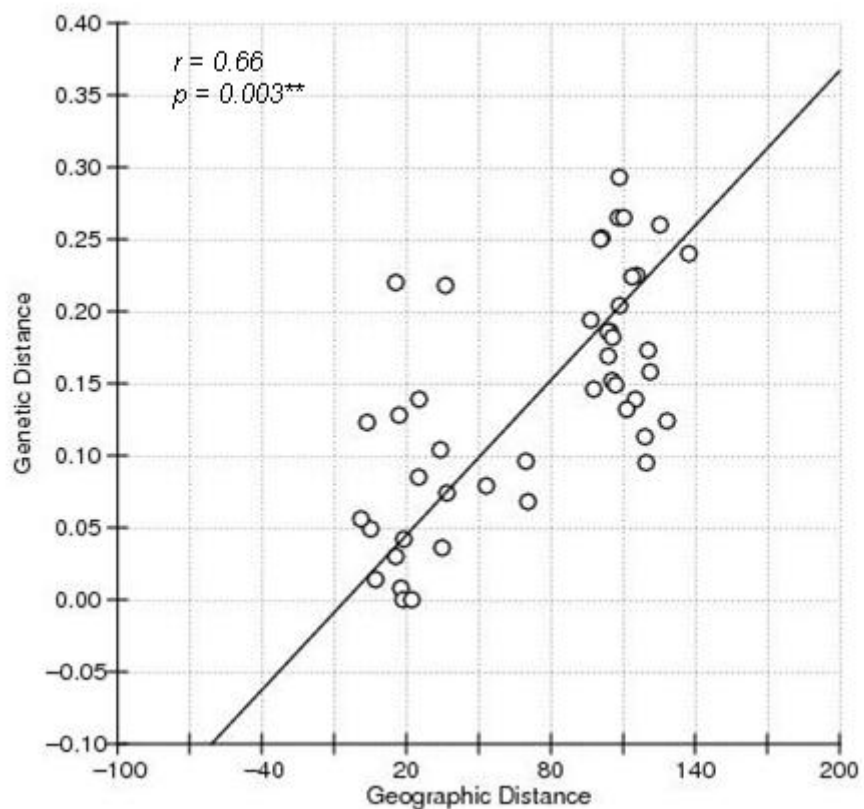


FIGURA 8. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata*.

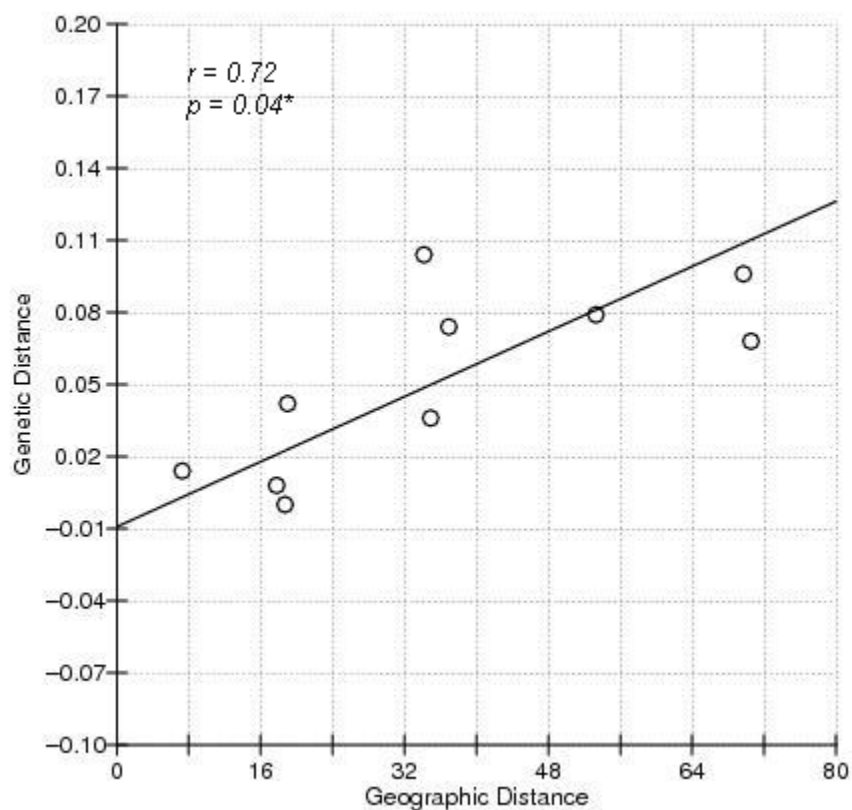


FIGURA 9. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008) entre las poblaciones del occidentales (Nanegalito, Chiriboga, Pahuma, Mindo y Cotopaxi). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata*.

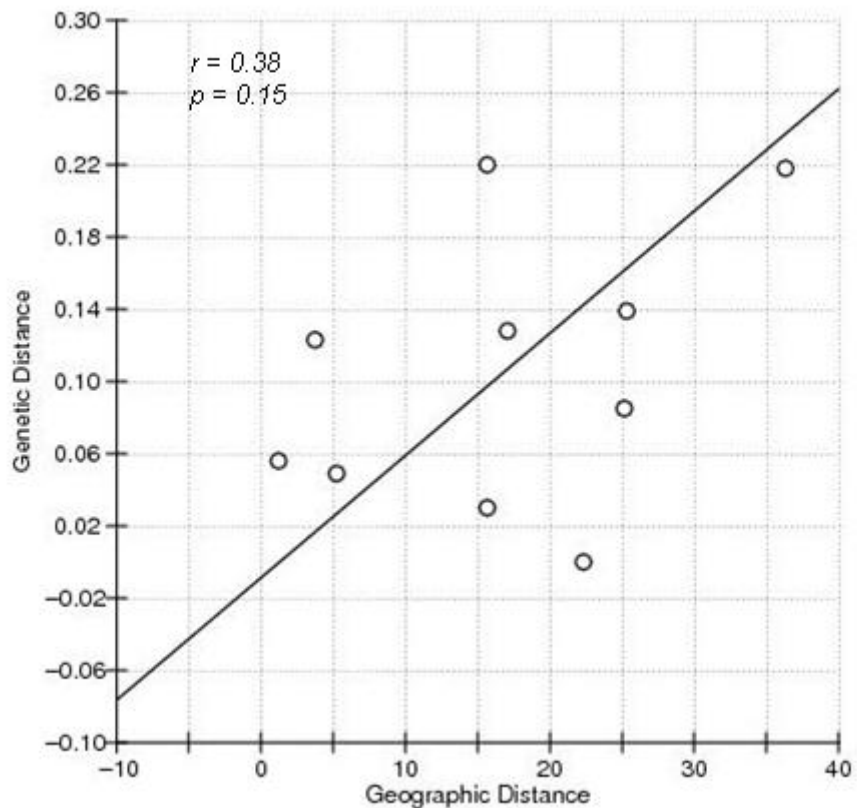


FIGURA 10. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética obtenida con el estadístico D (Jost, 2008) entre las poblaciones orientales (El Chaco, Cosanga, Borja, Baeza-antenas y Baeza-carretera). Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de poblaciones de *P. acuminata*.

9. TABLAS

TABLA 1. Primers amplificados bajo el protocolo PCR original.

Nombre	Especie	Autor	Amplificación de microsatélites
Ob01	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob02	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob04	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob06	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob07	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob08	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob09	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob16	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob17	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob18	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob19	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob20	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob21	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
Ob22	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
Ob23	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
D65A*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
D35B*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
E5(5c)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
A5(5a)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
C1(5b)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Positiva
H125C*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
E35C*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
D5(5c)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
G1(5a)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
D2(5a)*	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Negativa
AG5-7#9	<i>Oenocarpus bacaba</i>	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003	Positiva
AG5-7#7	<i>Oenocarpus bacaba</i>	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003	Positiva
AG5-5#1	<i>Oenocarpus bacaba</i>	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003	Positiva
AG5-5#6	<i>Oenocarpus bacaba</i>	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003	Positiva
EE2	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE3	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Positiva
EE8	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE9	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE15	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Positiva
EE23	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa

EE43	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE47	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE48	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE52	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Positiva
EE59	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa
EE63	<i>Euterpe edulis</i>	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001	Negativa

TABLA 2. Primers polimórficos utilizados en *P. acuminata* con su respectivo protocolo PCR.

Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
Ob01	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 57°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	*35 ciclos
	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C
Ob17	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 58°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	*35 ciclos
	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C
Ob19	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 4mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 59°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	*35 ciclos
	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C
AG5-7#9	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 57°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	*35 ciclos
	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C
AG5-5#1	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 3mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 57°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	*35 ciclos

	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento: 30 segundos a 57°C
	Primers (F y R): 0,15uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
AG5-	Taq: 1U	*35 ciclos
5#6	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C

TABLA 3. Valores p del análisis de desequilibrio ligado par cada par de loci en todas las poblaciones (método de Fisher) de *P. acuminata* obtenidos con el programa GenePop.

***valores altamente significativos no mostrados por Genepop.

Locus	Ob01	Ob17	Ob19	AG5-5#6	AG5-7#9	AG5-5#1
Ob01	0	0.183	0.984	0.030*	***	0.549
Ob17		0	0.706	0.081	***	0.991
Ob19			0	0.598	0.483	0.972
AG5-5#6				0	0.244	0.943
AG5-7#9					0	0.978
AG5-5#1						0

TABLA 4. Resumen de los resultados de diversidad genética de *P. acuminata* obtenidos con el programa Arlequin.

Población	n	Diversidad alélica (A)	Het observada (Ho)	Het esperada (He)	Alelos únicos	F_{IS}
Nanegalito	27	7,1	0,5	0,64	1	0,2224
Chiriboga	38	7	0,42	0,68	0	0,3714
Pahuma	20	6,7	0,6	0,67	1	0,1097
Mindo	30	6,8	0,54	0,63	0	0,14
Cotopaxi	12	5,5	0,48	0,61	0	0,2119
El Chaco	18	5,1	0,46	0,54	0	0,1528
Cosanga	18	5,7	0,58	0,62	1	0,0593
Borja	22	5,8	0,47	0,52	0	0,1003
Baeza (antenas)	21	5,3	0,41	0,53	0	0,2356
Baeza (carretera)	22	4,7	0,5	0,52	0	0,0343

TABLA 5. Matriz de valores D (Jost, 2008) entre poblaciones de *P. acuminata* con su respectiva significación estadística al 5% obtenida en el programa SPADE.

Nanegalito	Chiriboga	Pahuma	Mindo	Cotopaxi	El Chaco	Cosanga	Borja	Baeza (antena)
0								
0,074	0							
0,014	0,036	0						
0,008	0,042	-0,05*	0					
0,068	0,104	0,096	0,079	0				
0,293*	0,225*	0,251*	0,224*	0,24*	0			
0,113*	0,139*	0,131*	0,095	0,124	0,218*	0		
0,265*	0,203*	0,25*	0,265*	0,259*	-0,001*	0,22*	0	
0,152*	0,186*	0,146*	0,149*	0,158*	0,139*	0,03	0,123*	0
0,169*	0,186*	0,194*	0,182*	0,173*	0,084	0,128*	0,049	0,056

TABLA 6. Matriz de valores F_{ST} con su respectiva significación estadística al 5% entre poblaciones de *P. acuminata* obtenida en el programa Arlequin.

Naneg.	Chirib.	Pahuma	Mindo	Cotopaxi	El Chaco	Cosanga	Borja	Baeza (antenas)
0								
0,04187*	0							
0,02	0,02861*	0						
0,01	0,03028*	-0,0023*	0					
0,04542*	0,0752*	0,05331*	0,0463*	0				
0,12125*	0,13193*	0,11814*	0,11568*	0,12463*	0			
0,04893*	0,07341*	0,05348*	0,05142*	0,0694*	0,10812*	0		
0,14063*	0,13267*	0,1396*	0,15614*	0,16322*	0,04737*	0,12941*	0	
0,08373*	0,11139*	0,08378*	0,08815*	0,10571*	0,08827*	0,03327*	0,086*	0
0,09949*	0,12257*	0,10614*	0,10604*	0,1151*	0,07908*	0,08021*	0,06544*	0,04953

TABLA 7. AMOVA de las poblaciones de *P. acuminata* calculado en el programa Arlequin.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación
Entre grupos	1	33,418	0,12029	5,98**
Entre poblaciones	8	48,414	0,09502	4,72**
Dentro de poblaciones	446	800,975	1,79591	89,29**
Total	455	882,807	2,01122	

TABLA 8. AMOVA de las poblaciones occidentales de *P. acuminata* calculado en el programa Arlequin.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	4	20,149	0,06303	3,16**
Dentro de poblaciones	249	481,166	1,93239	96,84
Total	253	501,315	1,99542	

TABLA 9. AMOVA de las poblaciones orientales de *P. acuminata* calculado en el programa Arlequin.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	4	28,265	0,135	7,68**
Dentro de poblaciones	197	319,809	1,6234	92,32
Total	201	348,074	1,7584	

10. ANEXOS

ANEXO 1. Protocolo de extracción de ADN con el kit *PureLink™ Genomic Plant DNA Purification* de Invitrogen.

1. En los tubos con material vegetal triturado (100mg), se añadió 250ul de *Resuspension Buffer* (R2).
2. Posteriormente se añadió 15ul de SDS al 20% y 15 ul de RNAsa A (20mg/ml) y se mezcló con ayuda de un vórtex.
3. Se incubó los tubos a 55°C durante quince minutos.
4. Se centrifugó los tubos a máxima velocidad, y se recuperó el sobrenadante en nuevos tubos.
5. Se añadió 100ul de *Precipitation Buffer* (N2) a cada tubo con sobrenadante.
6. Se incubó los tubos en hielo durante cinco minutos y se los centrifugó nuevamente a máxima velocidad durante cinco minutos.
7. Se recuperó el sobrenadante (aproximadamente 200-250ul) en tubos nuevos y se añadió 375ul de *Binding Buffer* (B4) en cada tubo. Se mezcló con el vórtex y se transfirió la mezcla a columnas de lavado Invitrogen.
8. Se centrifugó a máxima velocidad durante treinta segundos y se desechó el buffer obtenido en la centrifugación (lo que pasó por la membrana).
9. Se añadió 500ul de *Wash Buffer* (W4) en cada columna, se centrifugó a máxima velocidad por treinta segundos, y se desechó el buffer.
10. Se realizó dos veces el mismo procedimiento que el paso 9, pero utilizando *Wash Buffer* (W5).

11. Se centrifugó los tubos a máxima velocidad durante dos minutos para desechar cualquier restante de buffer.
12. Se colocó la columna sobre un tubo con tapa limpio de 1,5ml, y se añadió 100ul de *Elution Buffer* (E1). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto. El buffer obtenido contiene gran cantidad de ADN (solución A).
13. Se repitió el paso 12 con la finalidad de obtener más ADN (solución B).

ANEXO 2. Preparación de geles de agarosa 1% con bromuro de etidio al 5%.

1. Se pesó 1gr de agarosa Invitrogen y se diluyó en 100ml de buffer TBE 1X con ayuda de un microondas.
2. Se añadió 5ul de bromuro de etidio a la solución una vez que se enfrió (50-60°C) para evitar que éste se evapore debido a su naturaleza tóxica.
3. La solución se colocó en un molde de la cámara de electroforesis, se colocó los peines y se esperó hasta que polimerice.
4. Una vez polimerizado, se colocó el gel en la cámara de electroforesis y se lo cubrió con buffer TBE 1X.

ANEXO 3. Preparación y tinción de los geles de poliacrilamida.

- Preparación y armado de los vidrios atrayente y repelente.
 1. Se lavó con jabón y se enjuagó con bastante agua los vidrios donde se polimerizará el gel.
 2. Una vez secos los vidrios, se los limpió tres veces a cada uno con etanol al 100%, sobre la cara tratada en ocasiones anteriores, mediante movimientos horizontales y verticales con ayuda de toallas de cocina.
 3. Al vidrio repelente se lo trató con 1,5ml de RainX (producto de venta libre utilizado para tratar parabrisas de autos) mediante movimientos horizontales y verticales con toallas de papel.
 4. Al vidrio atrayente se lo trató con una solución compuesta de 1ml de etanol al 100%, 5ul de ácido acético y 3ul de *Bind Silane* de Promega. Nuevamente mediante movimientos horizontales y verticales con toallas de papel. Se dejó secar por cinco minutos y se retiró el exceso con 0,5 ml de etanol al 100% mediante movimientos en un solo sentido con toallas de papel.
 5. Sobre la cara del vidrio atrayente se colocó los separadores, a la izquierda y derecha, que evitarán que la poliacrilamida se derrame por los lados. Se colocó encima el vidrio repelente, de manera que la cara tratada del mismo esté frente a la cara tratada del vidrio atrayente. Se selló la parte inferior de los vidrios con cinta adhesiva y se colocó varias pinzas sobre los separadores para que los vidrios permanezcan unidos.

- Preparación de la poliacrilamida al 6% con úrea 5M.
 1. Se pesó 24gr de úrea 5M, se colocó en un vaso de precipitación y se añadió 8ml de buffer TBE 10X.
 2. Se incubó la solución a 55°C hasta que la úrea esté bien disuelta, y se colocó el vaso en agitación.
 3. Se agregó 16ml de poliacrilamida (acrilamida:bisacrilamida en proporción 19:1) y se colocó la solución en una probeta.
 4. Se aforó con agua MilliQ a 80ml y se colocó la solución nuevamente en agitación.
 5. Se colocó 500ul de Persulfato de Amonio al 10% y 50ul de TEMED, que actúan como catalizadores en la polimerización del gel.
 6. Se colocó la solución en el espacio entre el vidrio repelente y atrayente precautelando que no se formen burbujas. Finalmente se colocó el peine con los dientes hacia afuera y se lo sujetó con pinzas para evitar que entre aire y se forme el frente de migración correctamente.

- Precorrida y corrida del gel.
 1. Una vez que el gel polimerizó, se retiró el peine, se limpió el frente de migración con agua para retirar el exceso de úrea y poliacrilamida, y se volvió a colocar el peine con los dientes hacia adentro de modo que hagan una pequeña incisión en el gel. Se retiró las pinzas y la cinta.
 2. Se colocó los vidrios con el gel en la cámara y se los sujetó a ésta mediante pinzas. Se llenó el compartimiento superior e inferior de la cámara con TBE 1X y se prosiguió a

precorrer el gel a 1500V (aproximadamente), 65mA y 75W hasta que alcance una temperatura aproximada de 50°C.

3. Se añadió buffer de carga (formamida 98%) en proporción 1:1 a las muestras y 1:20 a la escalera *10bp* de Invitrogen, para mantenerlas denaturadas. A las muestras se las calentó a 96°C por cinco minutos con el objetivo de denaturarlas físicamente, y a la escalera a 72°C por tres minutos.
 4. Se cargó las muestras en los pocillos del gel una vez que éste alcanzó la temperatura deseada.
 5. Se corrió el gel durante noventa minutos a 1500V (aproximadamente), 65mA y 75W.
- Fijación y tinción del gel.
 1. Una vez terminada la corrida, se desarmó la cámara y se separó los vidrios con ayuda de un destornillador. El gel debe quedar completamente adherido al vidrio atrayente.
 2. Se colocó el vidrio atrayente sobre una bandeja, con la cara donde está el gel hacia arriba, y se colocó encima un litro de la solución de fijación (ácido acético al 10% en agua MilliQ).
 3. Se retiró la solución de fijación después de una hora, o cuando los componentes de la formamida hayan desaparecido (una línea celeste por Xilen Cianol, o una azul por azul de bromofenol, ambos componentes de la formamida), y se la almacenó para usarla después.
 4. Se realizaron tres lavados de dos minutos cada uno con un litro de agua MilliQ bajo agitación constante.

5. Se colocó la solución de tinción, conformada por un litro de agua MilliQ, 1,5ml de formaldehído y 4ml de nitrato de plata al 25%, durante cuarenta y cinco minutos.
6. Se desechó la solución de tinción en una bandeja, y se lavó el gel con 100ml de agua MilliQ con el objetivo de retirar el exceso de plata.
7. Se colocó sobre el gel una de las soluciones de revelado, conformada por un litro de agua MilliQ, 30gr de carbonato de sodio, 1,5ml de formaldehído y 300ul de tiosulfato de sodio, y se agitó hasta observar las primeras bandas de la escalera o de los alelos. Se colocó la solución de revelado junto a la de tinción, y se desechó con cuidado por el lavabo.
8. Inmediatamente se colocó una segunda solución de revelado, idéntica a la anterior, hasta poder observar todas las bandas de la escalera y de los alelos. Cuando todas las bandas fueron visibles, se vertió sobre el gel la solución de fijación almacenada con anterioridad. Se desechó el ácido acético junto a la solución de fijación. Es importante que las soluciones de revelado sean enfriadas con anterioridad.
9. Una vez que la reacción entre el nitrato de plata y el carbonato de sodio se detuvo por acción del ácido acético, se cubrió el gel con un litro de agua MilliQ durante diez minutos.
10. Se retiró el gel del agua y se lo colocó en posición vertical para que se seque y pueda ser leído.