

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estructura genética de *Euterpe precatoria* (Mart.) en los Andes Tropicales.

Tesis previa a la obtención del título de Magister en Biología de la Conservación

JOSÉ MANUEL BARREIRO SÁNCHEZ

Quito, 2013

Certifico que la Tesis de Maestría en Biología de la Conservación del candidato José Manuel Barreiro Sánchez ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Rommel J. Montúfar

Director de la Disertación

Abril de 2013

## Agradecimientos

A Rommel J. Montúfar y Jean-Christophe Pintaud por su guía durante la realización de este trabajo.

Al proyecto PALMS-FP7 por el financiamiento para esta investigación.

A Finn Borchsenius y Katia Romoleroux por la facilitación de muestras de herbario para el estudio.

Al Equipo DYNADYV del Instituto para la Investigación y Desarrollo del Gobierno Francés (IRD).

Este trabajo fue realizado con éxito gracias a la cooperación de: Mónica Moraes de la Universidad Mayor San Andrés, La Paz, Bolivia; Betty Millán de la Universidad Mayor San Marcos, Lima, Perú; Gloria Galeano y Rodrigo Bernal de la Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia; Renato Valencia y Hugo Romero de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

## TABLA DE CONTENIDOS

1.	Resumen .....	1
2.	Abstract .....	2
3.	Introducción .....	3
3.1.	<i>Euterpe precatoria</i> .....	3
3.2.	Diversidad genética y conservación .....	5
3.3.	Genética del Paisaje (Landscape Genetics) .....	7
3.4.	Objetivos .....	8
3.4.1.	Objetivo General .....	8
3.4.2.	Objetivos Específicos .....	8
4.	Materiales y métodos .....	9
4.1.	Material vegetal .....	9
4.2.	Marcadores Moleculares Microsatélites.....	10
4.3.	Análisis de Estructura Poblacional .....	11
4.4.	Análisis Genético .....	12
4.5.	Análisis Filogenético .....	13
4.6.	Construcción de Mapas.....	14
5.	Resultados .....	14
5.1.	ADN y amplificación por PCR.....	14
5.2.	Análisis de estructura poblacional .....	15
5.3.	Análisis Genético .....	17
5.4.	Análisis Filogenético .....	18
6.	Discusión.....	19
6.1.	Tres grupos en lugar de dos .....	19
6.2.	Distribución geográfica de la diversidad genética .....	20
6.3.	Aislamiento en simpatría .....	22
6.4.	El uso la de Genética del Paisaje para la conservación de recursos genéticos vegetales.....	23
7.	Conclusiones y Recomendaciones .....	24
8.	Literatura citada .....	26

9. Figuras.....	36
Figura 2.....	38
Figura 3.....	39
Figura 4.....	40
Figura 5.....	41
Figura 6.....	42
Figura 7.....	43
Figura 8.....	44
Figura 9.....	45
Figura 10.....	46
Figura 11.....	47
10. Tablas.....	48
Tabla 1.....	49
Tabla 2.....	50
Tabla 3.....	50
Tabla 4.....	51
Tabla 5.....	52
11. Anexos.....	53
11.1. Anexo 1.....	54
11.2. Anexo 2.....	57
11.3. Anexo 3.....	60

## 1. Resumen

El estudio de los patrones geográficos de la diversidad genética de plantas es importante para el manejo y la conservación de las mismas. La relevancia de este tipo de estudios aumenta si la especie en cuestión es fuente de recursos para las poblaciones humanas. Esta investigación utiliza conceptos de genética del paisaje para la caracterización de la diversidad intraespecífica de *Euterpe precatoria* Mart., una palma neotropical de amplia distribución geográfica. Utilizando nueve microsátélites se exploró la estructura poblacional de la especie en los andes tropicales, y entre las dos subespecies reconocidas taxonómicamente (*E. precatoria* var. *precatoria* y *E. precatoria* var. *longevaginata*). Encontramos tres grupos genéticos distintos dentro de *E. precatoria*, uno de ellos corresponde a *E. precatoria* var. *longevaginata*, mientras que *E. precatoria* var. *precatoria* se separa en dos grupos genéticos. Se identificaron poblaciones dentro estos tres grupos, y se presenta evidencia de que ambas variedades no se reproducen en simpatria.

## 2. Abstract

The study of the geographic patterns of genetic diversity of plants is important for management and conservation. The relevance of such studies increases when the species in question provides resources for human populations. This research uses landscape genetic concepts for the characterization and understanding of the intraspecific diversity of *Eutperpe precatória* Mart., a neotropical palm tree with widely distributed. Using nine microsatellite markers we explored the population structure of the species in four Andean countries, and between the two subspecies recognized taxonomically (*E. precatória* var. *precatória* y *E. precatória* var. *longevaginata*). We found three distinct genetic groups within *E. precatória*, one of which corresponds to *E. precatória* var. *longevaginata*, whereas *E. precatória* var. *precatória* split into two genetic groups. Populations were identified within these three groups, and we present evidence that both varieties do not reproduce in sympatry.

### 3. Introducción

#### 3.1. *Euterpe precatoria*

*Euterpe precatoria* es una palmera neotropical que pertenece a la tribu Euterpeinae, en la subfamilia Arecoideae. Es una especie con amplia distribución geográfica y ocurre naturalmente en los bosques tropicales y subtropicales desde Guatemala hasta Bolivia. Su rango altitudinal abarca desde 0 a 2000 m.s.n.m. (Henderson *et al.*, 1995). Presenta tallos solitarios o cespitosos de entre 3 a 20 m de altura y 4-23 cm de diámetro (Figura 1), con un cono de raíces visibles en la base de color rojo brillante cuando son jóvenes. Hojas entre 5-10 (-20), vaina 0.5-1.6 m de largo incluyendo una lígula de 1-3 cm de largo, pecíolo de 12 a 57 cm de largo cubierto adaxialmente con escamas como las de vaina (pero ausentes en las hojas jóvenes). Inflorescencias horizontales, prófido de 22 a 88 cm; frutos globosos, de 0.9-1.3 cm de diámetro, estigma lateral; pericarpio púrpura-negro, semillas globosas con endospermo homogéneo (Henderson y Galeano, 1996).

A pesar de su extensa distribución y amplitud ecológica sólo dos categorías infraespecíficas han sido reconocidas: (i) *Euterpe precatoria* var. *precatoria* es una palmera monocaule de 5 -20 m de alto, y 5-10 cm de diámetro, de tallos solitarios, hojas de 2.1-3.6 m, inflorescencias infrafoliares, distribuida en las tierras bajas de selva tropical, comúnmente a lo largo de los ríos y bosques inundables, por debajo de 350 m.s.n.m., en ocasiones alcanza los 600 m en las estribaciones orientales de los Andes; y (ii) *Euterpe precatoria* var. *longevaginata* con tallos solitarios o cespitosos, hojas más pequeñas, distribuida en bosques subtropicales y tropicales ubicados en zonas de montaña, laderas y crestas, o en las tierras bajas, desde 0-2000 en América

Central, la región del Chocó y las estribaciones de los Andes. En el lado oriental de la Cordillera de los Andes de la variedad *precatória* crece hasta un límite cercano a los 900 m.s.n.m., y se sustituye por la variedad *longevaginata* en terrenos más elevados (Henderson y Galeano, 1996). Existen localidades donde poblaciones de las dos variedades coexisten en simpatria en torno al umbral altitudinal, por ejemplo la localidad de Tingo María en Perú. Estas dos variedades fueron originalmente descritas como especies diferentes por Martius en 1835 (d'Orbigny *et al.*, 1835). Estudios taxonómicos posteriores reunificaron estas taxa en una sola especie denominada *E. precatória* (Henderson, 1995).

*E. precatória* es fuente de diversos productos forestales no maderables y ha sido calificada como una de las especies promisorias de palmeras amazónicas debido a su potencial económico (Kahn, 1988). Recientes estudios han descrito hasta 89 usos diferentes de los productos de *E. precatória* entre los pobladores de los bosques tropicales (Macía *et al.*, 2011), entre los usos están usos alimenticios, para la construcción, culturales, medicinales, entre otros. Debido a la variedad de servicios que ofrece y a la diversidad de grupos humanos que la cosechan, *Euterpe precatória* presenta los mayores valores de importancia económica y cultural entre las palmas amazónicas (Kvist *et al.*, 1995; Macía *et al.*, 2011). El principal uso de esta especie es la cosecha de su palmito para los mercados locales o internacionales (Shanley *et al.*, 2002). La cosecha del palmito afecta la demografía de *E. precatória* (Zuidema y Boot, 2000) ya que la palma tiene que ser sacrificada con el fin de acceder al palmito. Esta actividad económica fue responsable en la década 1980s de la disminución de las poblaciones cercanas a Iquitos, Perú (Peters, 1994), y en la Amazonia norte de Bolivia

a principios de los años 2000 (Stoian, 2004). Pero el potencial de *E. precatória* no sólo se limita a mercados locales y usos tradicionales; la especie es también una fuente prometedora de compuestos antioxidantes (frutos) y anti-maláricos (raíces) de gran interés para la industria química y farmacéutica (Jensen *et al.*, 2002; Pacheco-Placencia *et al.*, 2009).

A pesar de la amplia distribución, importancia económica y potencial de *Euterpe precatória* no hay información acerca de su diversidad genética ni estructura poblacional.

### **3.2. Diversidad genética y conservación**

El estudio de la diversidad genética en las poblaciones silvestres es de importancia en diferentes disciplinas como la conservación, la ecología y la taxonomía. La diversidad genética que se encuentra dentro de los individuos y de las poblaciones naturales funciona como la base de todas las expresiones de la diversidad biológica (Thompson, 2009) y es un objetivo importante para la conservación tal como lo recomienda la Unión Mundial para la Naturaleza (McNeely *et al.*, 1990). Debido a que la diversidad genética es esencial para la capacidad de adaptación de las poblaciones de plantas (Booy, 2000) y a que se correlaciona con la “aptitud” ecológica y evolutiva (*fitness*) (Reed y Frankhan, 2002), puede promover la regeneración natural y la adaptación a los cambios ambientales (DeHayes *et al.*, 2000). Adicionalmente, Hughes *et al.*, (2008) han reportado que la diversidad genética es también relevante en los procesos ecológicos a nivel de población, comunidad y ecosistema. El estudio y la

caracterización de la diversidad genética en poblaciones silvestres sirve también para resolver problemas taxonómicos y realizar análisis de viabilidad poblacional (Frankham, 2010). También, la identificación de unidades de conservación y manejo es crucial para mantener especies y variedades, y para identificar efectos de la actividad humana sobre poblaciones silvestres (Palsbøll *et al.*, 2007).

Si los factores genéticos son ignorados se puede subestimar el riesgo de extinción de una especie, variedad o población (Frankham, 2005). Las estrategias de conservación por lo tanto, deben centrarse en el mantenimiento de la diversidad genética en diferentes niveles, pero para esto es importante primero contar con información confiable al respecto. Es por esto que estudios de diversidad y estructura poblacional genética son fundamentales para la conservación (DeSalla y Amato, 2004).

En casos donde la especie tiene amplia distribución geográfica puede existir diversidad genética no detectada o críptica. La diversidad críptica es cada vez más estudiada ya que ofrece nuevas perspectivas ecológicas y de conservación (Bowen *et al.*, 1993; Ravaoarimanana, 2004). Con la llegada de las herramientas moleculares y su aplicación en sistemas de poblaciones silvestres el estudio de la diversidad críptica se ha incrementado de manera considerable (Bickford *et al.*, 2007). Se ha detectado diversidad críptica en diversos organismos (Vrijenhoek. *et al.*, 1994; Hebert *et al.*, 2004; Feulner, *et al.*, 2006; Grundt. *et al.*, 2006), tanto en los trópicos como en las zonas templadas del planeta.

Existen varios métodos para estudiar diversidad genética. En este trabajo se utilizó repeticiones de secuencia simple (SSR) o microsatélites como marcadores genéticos

debido a su utilidad en el estudio de la diversidad genética en las palmas neotropicales (Montúfar y Barreiro, 2010). Elegimos el análisis espacial de la diversidad, ya que puede proporcionar información para el estudio del mantenimiento y la dinámica de las poblaciones de plantas y tienen gran aplicabilidad en la conservación (Escudero *et al.*, 2003). Este estudio se centró en la exploración de la estructura genética de la especie a nivel regional, la caracterización de las discontinuidades genéticas y la identificación de poblaciones dentro de la distribución de la especie.

### **3.3. Genética del Paisaje (Landscape Genetics)**

La genética del paisaje (Landscape genetics) es una disciplina que reúne a la genética de poblaciones con la ecología de paisaje y con los sistemas de información geográfica para explorar los patrones y las causas de la distribución geográfica de la diversidad genética. El carácter interdisciplinario es central en el estudio de la ecología de paisaje (Holderegger y Wagner, 2008.). Esta creciente rama de la investigación ha demostrado ser de gran ayuda en el estudio y la conservación de varios grupos de organismos ya que los investigadores pueden combinar la alta resolución de los datos genéticos con el poder de análisis de los sistemas de información geográfica.

De manera amplia, la genética del paisaje busca relacionar la influencia de los procesos ecológicos con la estructura y diversidad genética (Storfer *et al.*, 2007). Para lograr este objetivo una parte de la genética del paisaje utiliza métodos bayesianos de

asignación poblacional. Estos métodos han dado resultados positivos en el estudio de la genética de poblaciones (Shoemaker *et al.*, 1999).

Los sistemas de información geográfica pueden relacionar a la información genética con información relevante para la conservación como los efectos del cambio climático o la inclusión o no de poblaciones susceptibles en sistemas de parques nacionales y otras áreas de protegidas (van Zonneveld *et al.*, 2012). La información geográfica de patrones sociales también puede ser contrastada con éxito frente a distribución de diversidad genética para identificar posibles causas de erosión genética o domesticación (Willemen *et al.*, 2007). De esta manera se pueden identificar grupos focales y poblaciones de prioridad para la conservación. También se pueden mapear índices de diversidad relevantes para la conservación como la riqueza de alelos (Petit *et al.*, 1998) o el número de alelos comunes locales (Frankel *et al.*, 1995).

### **3.4. Objetivos**

#### **3.4.1. Objetivo General**

Estudiar la estructura de la diversidad genética de *Euterpe precatoria* mediante marcadores moleculares microsatélites.

#### **3.4.2. Objetivos Específicos**

- Estudiar las discontinuidades genéticas a nivel intraespecífico de *Euterpe precatoria*.
- Evaluar la dinámica del flujo génico en regiones de simpatría entre las variedades *longevaginata* y *precatoria*.

- Identificar poblaciones y áreas geográficas para la conservación de la diversidad de *Euterpe precatoria*.

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.1. Material vegetal

Un total de 395 plantas de *E. precatoria* en 58 diferentes localidades de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia fueron analizadas en el presente estudio (Figura 2). Se identificaron 190 muestras de la variedad *E. precatoria* var. *longevaginata* y 205 de la variedad *precatoria*. Un total de 381 muestras fueron recolectadas en el campo entre diciembre de 2009 y enero de 2011, y 21 muestras del Herbario AAU (Aarhus, Dinamarca) se incorporaron para aumentar el área de distribución geográfica en los cuatro países. Adicionalmente cinco especímenes de *E. catinga* y dos de *E. oleracea* del herbario AAU se incluyeron para servir como grupo externo en el análisis filogenético. Todas las muestras contaron con coordenadas geográficas de su lugar de origen. Los tejidos recolectados en el campo fueron mayoritariamente foliares, en el caso de que las hojas de la palmera fuesen inaccesibles se recolectó tejido de meristema de la raíz. Todos los tejidos de campo fueron preservados en silica gel para garantizar la preservación del ADN. El material genético de las muestras de herbario fue obtenido de tejido foliar. Todas las extracciones de ADN se llevaron a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (PUCE) utilizando el kit Dneasy Plant Minikit de Qiagen, y siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1).

## 4.2. Marcadores Moleculares Microsatélites

Se seleccionaron 25 marcadores microsatélites desarrollados previamente para las especies *Euterpe oleracea*, *E. edulis*, *Oenocarpus bataua* y *O.bacaba* que son especies relacionadas con *E. precatória*, (Gaiotto *et al.*, 2001; Lepsch-Cunha *et al.*, 2003; Montúfar *et al.*, 2007); 8 de estos microsatélites se seleccionaron para análisis ulterior debido a su nivel de polimorfismo y a la intensidad de la señal que producían; además, se incluyeron dos microsatélites de intrones nucleares (Ludeña *et al.*, 2011) para la determinación del genotipo. La caracterización se realizó con un total de nueve microsatélites (Tabla 1). La genotipificación se llevó a cabo en las instalaciones del IRD-Montpellier (Francia). Los 10 loci fueron amplificados en dos reacciones de PCR múltiple, cinco cebadores de cada reacción múltiple. Este tipo de metodología permite la optimización en el tiempo de la generación de datos, ya que se amplifica más de un locus a la vez. Los cebadores se marcaron fluorescentemente utilizando los colorantes VIC, NED, 6-FAM, PET. El kit Qiagen Multiplex PCR fue usado para realizar la amplificación de PCR siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2), y con una temperatura de anillamiento ( $T_m$ ) de 57 ° C. Esta temperatura lograba una buena amplificación para todos los loci. Se utilizó el marcador de peso GeneScan™ -500 LIZ standard size® como estándar de tamaño. Los productos de PCR fueron diluidos 200 veces y se corrieron en un secuenciador Genetic Analyzer 3500 de Applied Biosystems en las instalaciones del Instituto de Investigación Agronómica para el Desarrollo CIRAD en Montpellier, Francia. Los electroferogramas fueron analizados,

editados y corregidos usando el programa GeneMarker de Softgenetics (State College, PA, EE.UU.).

### **4.3. Análisis de Estructura Poblacional**

Para estimar la estructura de la población de las muestras se utilizó un método de agrupamiento Bayesiano implementado en el programa STRUCTURE 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). En este procedimiento, el número óptimo de grupos genéticos (K) se escoge mediante la comparación de las probabilidades posteriores de cada valor K de ajustarse a un modelo (en este caso el equilibrio de Hardy-Weinberg), y se escoge el número de poblaciones para el que la probabilidad posterior llega a estabilizarse alrededor de un máximo (Pritchard *et al.*, 2000). También estimó el estadístico de corrección Delta K ( $\Delta K$ ) según Evanno *et al.*, (2005). Este índice indica el cambio en la magnitud de las probabilidades posteriores con respecto a un K inmediatamente superior; el número de grupos en el que  $\Delta K$  alcanzó su punto máximo se consideró óptimo. Es importante comparar estos dos indicadores ya que el comportamiento de la probabilidad posterior suele arrojar resultados equivocados (Evanno *et al.*, 2000).

Con el fin de analizar la estructura genética de las muestras en jerarquía nosotros: (i) realizamos un análisis de estructura con una muestra aleatoria por cada localidad (n = 58); utilizamos 1000000 iteraciones de análisis después de 30000 iteraciones de calentamiento; el modelo de frecuencias independientes y no aditivo del programa STRUCTURE fue utilizado en este primer paso; realizamos 10 análisis Bayesianos independientes para calcular  $\Delta K$ . A los agrupamientos resultantes en este primer nivel jerárquico se los llamará en adelante “grupos”. Y (ii) investigamos la subestructura

dentro de los grupos que se encontraron en el paso anterior; para este segundo análisis se utilizó la totalidad de las muestras y se hicieron tres análisis diferentes, uno para cada grupo, de acuerdo a los resultados obtenidos en el procedimiento anterior ( $K = 3$ ) (Grupo 1  $n = 190$ ; Grupo 2  $n = 139$ ; Grupo 3  $n = 66$ ). Esta vez usamos 100000 iteraciones de análisis luego de 25000 iteraciones de calentamiento, y frecuencias independientes con el modelo de aleatorización. Por cada grupo se realizaron 10 corridas independientes del análisis para calcular  $\Delta K$ . A los grupos resultantes de este segundo nivel jerárquico se los llamará en adelante “Poblaciones”.

Por otro lado buscamos el mejor  $K$  en 60 muestras de la localidad de Tingo María, Perú, donde las dos variedades son simpátricas. Las muestras fueron colectadas en dos sitios relativamente cercanos (16 km): 1 ladera de montañas ( $n=30$ ) y planicies semi-inundadas ( $n=30$ ). Debido al hábito ecológico del lugar de muestreo, y a la presencia de individuos adultos de una de las dos variedades, se consideró a las muestras de las laderas de montaña como *Eutperpe precatória* var. *longevaginata*, y a las muestras planicie como *Eutperpe precatória* var. *precatória*. Sin embargo dentro de las muestras de ambas localidades estaban individuos juveniles de difícil clasificación. En este análisis se construyó un gráfico que indica la proporción del genotipo de cada muestra de pertenecer a uno de los grupos genéticos encontrados.

#### **4.4. Análisis Genético**

La distancia genética entre pares de individuos (Smouse y Peakall, 1999) fue calculada para todos los individuos. Estas distancias genéticas se utilizaron a continuación para realizar un análisis de coordenadas principales (PCoA) con el fin de

representar las distancias en un plano cartesiano. También se calculó la distancia genética de Nei entre los grupos (Nei, 1972) tanto para los grupos como para las poblaciones. El índice de fijación ( $F_{ST}$ ) entre grupos y entre poblaciones fue estimado a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA). Mediante este análisis también se estableció la distribución de la varianza molecular entre los diferentes niveles jerárquicos establecidos en el análisis de STRUCTURE; en el AMOVA se realizaron 9999 permutaciones para fomentar la robustez del análisis. También se calcularon estadísticos descriptivos como la heterocigocidad esperada, el número total de alelos, el número efectivo de alelos, el número de alelos únicos para cada grupo. Todos estos análisis se realizaron utilizando el software Genalex versión 6,41 (Peakall y Smouse, 2006).

#### **4.5. Análisis Filogenético**

Para representar las relaciones entre las muestras y entre los grupos encontrados, construimos un árbol Neighbour Joining (NJ) con la ayuda del programa informático PHYLIP (Felsenstein, 2005) utilizando las distancias genéticas de Smouse y Peakall (entre individuos) y de Nei (entre grupos de individuos) calculadas anteriormente. Se construyó un árbol de relaciones genéticas entre individuos y uno entre grupos. Las muestras de *E. oleracea* y *E. catinga* se utilizaron como grupo externo para poner raíz a los árboles. Los árboles fueron editados utilizando el programa TreeDyn (Chevenet *et al.*, 2006).

#### **4.6. Construcción de Mapas**

Para dibujar la distribución geográfica de la probabilidad de pertenencia a cada uno de los grupos se realizó un agrupamiento Bayesiano y espacial utilizando el algoritmo implementado en el programa Genenad (Guillot *et al.*, 2005). Todas las muestras de *Euterpe precarotia* ( $n = 395$ ) y todos los datos genéticos fueron utilizados en este análisis. Las barreras fueron detectadas como áreas geográficas con baja probabilidad posterior. Se realizó una cadena de Markov Monte Carlo utilizando un valor corrección de  $K = 3$  poblaciones (frecuencias de los alelos no correlacionadas; 100000 generaciones, frecuencia de muestreo 100; 30000 generaciones de calentamiento), ya que este valor de  $K$  fue el óptimo en el análisis de estructura anterior.

Se construyó un mapa que muestra la distribución geográfica de los resultados del análisis de STRUCTURE, tanto de los grupos como de las poblaciones dentro de los grupos. Este mapa se dibujó usando el programa de análisis información geográfica DIVA-GIS 7.4.

### **5. Resultados**

#### **5.1. ADN y amplificación por PCR**

Se obtuvo ADN de calidad para la totalidad de las muestras ( $n=402$ ). Todos los cebadores, con excepción de OB8, fueron amplificados y mostraron señales polimórficas. El número de alelos totales en la muestra fue de 26, 32, 13, 23, 17, 33, 21, 22 y 24 para los loci AG1, AC5-3 # 4, GA5-5 # 1, EE59, CUC3, Ob2, EE63, OB6 y OB16, respectivamente.

## 5.2. Análisis de estructura poblacional

El agrupamiento Bayesiano en el nivel jerárquico de análisis identificó tres grupos utilizando una muestra por cada localidad. Los valores del logaritmo de la probabilidad incrementó de  $K = 1$  a  $K = 3$  y luego se estabilizó (Figura 3A). También el estadístico  $\Delta K$  un confirmó  $K=3$  grupos genéticos (Figura 3A). El Grupo 1 agrupa las muestras de *E. precatória* var. *longevaginata*; las muestras de la *E. precatória* var. *precatória* fueron separadas en los grupos 2 y 3.

Por otro lado las 60 muestras de la región de simpatría mostraron un valor óptimo de  $K$  y  $\Delta K$  para dos grupos (Figura 4A). Uno de los grupos ( $n=36$ ) comprendía a todas las muestras colectadas en laderas (*E. precatória* var. *longevaginata*) más algunas muestras colectadas en planicie; mientras que el otro ( $n=24$ ) comprendía a las restantes muestras colectadas en la planicie (*E. precatória* var. *precatória*). El gráfico de proporción del genotipo de pertenecer a uno de los dos grupos indicó que no existen individuos con genotipos mixtos (Figura 4B), incluso entre colectados en el mismo lugar (planicie inundada). Esto indica un fuerte aislamiento reproductivo en simpatría de las dos variedades de *E. precatória*.

En el análisis de estructura geográfica en el programa Geneland usamos  $K = 3$  grupos (por los resultados del análisis de STRUCTURE) y se incluyó a todas las muestras ( $n = 395$ ) y toda la información genética recopilada de microsatélites, los resultados indican la probabilidad geográfica para cada grupo: El grupo 1 ( $n = 190$ ) se encuentra en la región del Chocó y los Andes de Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia, de manera

consistente con la distribución de *E. precatória* var. *longevaginata*; el grupo 2 (n = 139) se encuentra en la cuenca amazónica de Ecuador y Perú; mientras que el cúster 3 (n = 66) muestra un patrón discontinuo entre las regiones amazónicas del noroeste de Bolivia, Sur-Perú y Colombia al este noreste (Figura 5); este patrón discontinuo puede deberse a la falta de sitios colectados en la Amazonía de Brasil. En este tipo de análisis se toma en cuenta la ubicación geográfica de cada muestra para establecer el área geográfica de las probabilidades, es notable que aún tomando en cuenta esta información se obtengan discontinuidades genéticas en espacios geográficos pequeños como en la zona del Puyo en la Amazonía ecuatoriana. Estas discontinuidades corresponden a áreas de transición entre bosque tropical y subtropical.

Mediante el análisis de subestructura se identificaron cinco poblaciones dentro del grupo 1 (poblaciones 1 a 5) y dos poblaciones en el grupo 3 (población 8 y 9). El número de poblaciones en el grupo 2 no es claro debido a que el comportamiento del logaritmo de la probabilidad y el  $\Delta K$  mostraron resultados contradictorios que sugieren una estructura débil dentro de este grupo (Figura 3C), sin embargo asumimos dos poblaciones (poblaciones 6 y 7) basados en el pico más alto de  $\Delta K$  para la representación geográfica y posterior interpretación de las poblaciones dentro de este grupo.

La distribución geográfica de todas las muestras, las poblaciones y grupos pueden verse en la Figura 6.

### 5.3. Análisis Genético

El análisis de coordenadas principales mostró tres grandes grupos bien separados (Figura 7). Los grupos identificados mediante el PCoA corresponden a los grupos identificados en el análisis de la STRUCTURE y Geneland. Estos resultados apoyan la hipótesis de una fuerte estructura genética de las muestras y confirman el grupo que contiene a las muestras de la variedad *longevaginata*, y los dos grupos en los que se separan las muestras de la variedad *precatória* en el primer nivel jerárquico de análisis. Los dos primeros ejes del PCoA explican el 56% de la varianza genética.

Los  $F_{ST}$  s calculados entre los grupos y entre las poblaciones fueron todos diferentes de los valores esperados por azar (Anexo 3). Estos indicadores sugieren una estructura genética fuerte entre los tres grupos, pero también diferentes grados de aislamiento entre las poblaciones dentro de los grupos (Tabla 2). Independientemente del valor  $F_{ST}$  (0,46) calculada entre los dos grupos genéticos en la región simpatria (Tingo María,  $n = 60$ ) indica una fuerte segregación y aislamiento entre las muestras de ambas variedades aunque compartan el espacio geográfico (Tabla 3).

Los índices de fijación ( $F_{ST}$ ) de los grupos 1 y 2 (0,427; 0,52 respectivamente) son mayores que el del grupo 3 (0,307), lo que significa que este último es menos diverso. Este patrón de diversidad entre los grupos es apoyado por el número de alelos y alelos efectivos, así como la heterocigocidad esperada y el número de alelos únicos (Tabla 3).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) encontró que el mayor porcentaje de varianza molecular (34%) de la muestra está dentro de los individuos. Sin embargo, la

división en grupos y poblaciones contribuyen grandemente a la varianza también, con un total combinado de 47% de varianza explicada. (Figura 8)

Las poblaciones dentro de los grupos presentaron diferentes patrones de diversidad. Las poblaciones 1 y 2 fueron las más diversas dentro grupo 1 (Figura 9); y son también las que mayor distribución geográfica presentan dentro de este grupo. Las poblaciones 3, 4 y 5 son las menos diversas y las se encuentran geográficamente más concentradas (Figura 6). Dentro de los grupos 2 y 3, las poblaciones que mostraron niveles más altos de diversidad fueron poblaciones 7 y 8, respectivamente (Tabla 4); estas poblaciones también mostraron una mayor distribución geográfica con respecto a las menos diversas.

#### **5.4. Análisis Filogenético**

El árbol de Neighbor Joining muestra las relaciones de distancia entre todas las muestras (Figura 10); los mismos tres grupos descritos anteriormente pueden ser fácilmente identificados, así como las nueve poblaciones dentro de éstos; el grupo externo se localizó más cerca del grupo de muestras de *E. precatoria* var.

*longevaginata* (grupo 1). Resultados semejantes se obtuvieron para el árbol de las poblaciones (Figura 11). Esto puede sugerir una divergencia más reciente de los grupos 2 y 3 (*E. precatoria* var. *precatoria*), aunque el análisis no es concluyente, ya que sólo representa los datos de distancia genética y no ascendencia.

## 6. Discusión

### 6.1. Tres grupos en lugar de dos

De acuerdo con la clasificación taxonómica de las variedades de *E. precatória* se esperaba encontrar dos grupos genéticos distintos, uno para cada variedad. Contrario a esta hipótesis, las muestras analizadas se separaron en tres grupos en el primer nivel de estructura jerárquica. Uno de estos grupos corresponde con lo que hoy conocemos como *E. precatória* var. *longevaginata*.

*E. precatória* var. *longevaginata* fue originalmente descrita por Martius como una especie diferente (*Euterpe longevaginata*) de *E. precatória* (D'Oribigny, 1836) debido a las diferencias morfológicas evidentes en la morfología de la hoja, flor y tallo, así como diferencias en distribución y nicho ecológico. El espécimen tipo de *E. longevaginata* procede del bosque subtropical de Bolivia. Posteriormente ambas especies fueron sinonimizadas bajo el nombre de *E. precatória* por Henderson (1995) en su revisión taxonómica del género. Este caso no es aislado en la historia taxonómica de las palmeras neotropicales: *Oenocarpus bataua* var. *bataua* y *O. bataua* var. *oligocarpus* fueron originalmente descritas como especies diferentes y posteriormente agrupadas en un sólo taxa (Henderson, 1995); aunque evidencia molecular reciente sugiere que pueden ser de hecho especies distintas (Montúfar y Pintaud, 2008). El género *Attalea* es también un ejemplo en el que los problemas históricos de taxonomía hacen difícil la identificación de especies (Pintaud, 2008). Nuestros datos soportan la hipótesis de que la variedad *longevaginata* es una entidad diferente dentro de *E. precatória*.

La taxonomía de los organismos idealmente debe reflejar entidades naturales reales (Turrill, 1942). En *E. precatoria* se reconocen dos variedades taxonómicas, pero nosotros encontramos tres grupos genéticos. Estos tres grupos genéticos están separados entre sí por valores de  $F_{ST}$  similares (Tabla 2), es decir que el grupo 1 (*longevaginata*) es tan diferente del grupo 2 como lo es el 2 del 3. Esto es notable ya que taxonómicamente solamente se consideran dos variedades dentro de la especie, y porque morfológicamente los individuos del grupo 2 son muy semejantes a los del grupo 3. En este caso el presente estudio se reporta una diversidad genética importante pero críptica.

La presencia de diversidad críptica en *E. precatoria* abre muchas interrogantes respecto a los procesos de evolución y mantenimiento de diversidad en las palmeras neotropicales. Por ejemplo cuáles son los mecanismos que mantienen separados a los grupos 2 y 3, y cómo se originaron estas unidades evolutivas que en la actualidad funcionan como entidades independientes. Savolainen *et al.*, (2006) sugieren que mecanismos de polinización y heterocronía mantienen separadas diferentes especies hermanas incluso en simpatria.

## **6.2. Distribución geográfica de la diversidad genética**

El patrón geográfico de la diversidad genética del primer nivel jerárquico que se revela en nuestro estudio corresponde a las mayores regiones botánicas y geológicas en el Neotrópico: los Andes y la región del Chocó (Grupo 1), la Amazonia Occidental (Grupo 2) y la Amazonia Central (Grupo 3). Estas regiones tienen características

climáticas y ecológicas particulares, y son el resultado de una compleja historia geológica que ha influido en la diversidad y la evolución de la flora de América del Sur desde el Paleógeno temprano (60 millones de años) (Tassinari y Macambira., 1999).

El levantamiento de los Andes fue la fuerza principal para la conformación de un paisaje heterogéneo (Fine *et al.*, 2005). Antes del Oligoceno (23 millones de años) la parte tropical del continente estaba cubierta de una flora con elementos característicos de las tierras bajas (Wesselingh y Salo, 2006); durante Neógeno (23-10 millones de años) los Andes ya habían cambiado el paisaje y aparecieron los primeros componentes pre montanos en la zona; al mismo tiempo un sistema de humedales conocido como el sistema Pebas cubría la mayor parte del área de la actual Amazonía occidental (Rigsby *et al.*, 2010). En el siguiente período, la flora andina se diversificó y el mar Pebas se secó dejando un área de tierra rica en sedimentos para ser colonizada (10 a 5 millones de años). El resultado de estos procesos es un mosaico de regiones con características geológicas y biológicas diferentes (Wesselingh *et al.*, 2006). La distribución de los grupos reportados concuerda con este mosaico. El grupo *longevaginata* (Grupo 1) se encuentra en la zonas andinas más altas, también más frías y húmedas, típico de las vertientes andinas y el Chocó; el grupo 2 (que contiene a parte de las muestras de la variedad *precatória*) se encuentra en la amazonía occidental, una zona que alberga la mayor biodiversidad alfa en de árboles tropicales en el mundo (Valencia *et al.*, 1994). Las características ecológicas de ésta zona son los altos niveles de precipitación (3000 mm), baja estacionalidad y un mosaico de suelos rico en sedimentos (Dalling *et al.*, 2007). El grupo 3 (que incluye a las restantes

muestras de la variedad *precatória*) se ubica sobre la Amazonía central que es la más antigua de estas regiones en términos geológicos, y que presenta un clima diferente y suelos menos ricos (Malhi *et al.*, 2002). En particular las dos regiones identificadas donde se encuentran las muestras del grupo 3 son el Sur este de Colombia y el Noreste de Bolivia, ambas zonas corresponden a regiones marginales de la cuenca amazónica con una marcada estacionalidad (Negri *et al.*, 2000).

### **6.3. Aislamiento en simpatría**

Las implicaciones de que dos poblaciones relacionadas no experimenten intercambio genético son de importancia para la conservación, taxonomía y para el estudio de modelos de evolución. A pesar de que existe todavía controversia acerca qué concepto de especie biológica es el más idóneo para estudiar la naturaleza (Cellinese *et al.*, 2012), existe poca controversia cuando se encuentra que dos poblaciones tienen aislamiento reproductivo en simpatría (Frankham *et al.*, 2012).

En este estudio se encontró individuos de ambas subespecies coexistiendo en simpatría en la localidad de Tingo María (Perú) y no se detectó evidencia de hibridación o introgresión (Figura 4). Los genotipos caracterizados de todos los individuos analizados pertenecían en su totalidad a una de las dos subespecies (Figura 4B). Los resultados ofrecen una importante evidencia a nivel molecular que sugiere que ambas variedades son especies distintas debido a la presencia de barreras en el flujo génico.

Entre las posibles barreras pueden estar desde polinizadores especializados diferentes o fases fenológicas dispares que no favorecen el flujo génico. En otros ejemplos de especies hermanas simpátricas en palmas, el pH del suelo y la fenología juegan un papel determinante para evitar la creación de híbridos (Savolainen *et al.*, 2006). También se ha demostrado que los polinizadores son especie-específicos en algunas especies de palmas, y que este mecanismo mantiene la identidad genética (Barfod *et al.*, 2011). El origen y los procesos que garantizan la separación de las variedades de *E. precatória* en simpatría deben ser estudiados más a fondo, así como su estatus taxonómico.

#### **6.4. El uso de la Genética del Paisaje para la conservación de recursos genéticos vegetales**

A pesar de que en la actualidad existen nuevas técnicas de análisis geográficos, y de que los estudios con marcadores genéticos se han generalizado, la aplicación de la genética del paisaje es todavía escasa en conservación de diversidad en plantas (Escudero *et al.*, 2003). Aunque existen algunos estudios en los que se ha mapeado la diversidad genética de árboles para fomentar su conservación (Lowe *et al.*, 2000; Soares *et al.*, 2008; Sork y Smouse, 2006), éstos todavía no son numerosos en especies silvestres (Holdergger *et al.*, 2010).

A pesar de que no se muestreó toda el área de distribución de la especie se pudo identificar grupos genéticos importantes, su distribución geográfica, su diversidad y su aislamiento genético. De esta manera identificamos las poblaciones más diversas dentro de cada grupo (Figura 9B), estos resultados muestran que las poblaciones de

Lita (Ecuador) y Pucallpa (Perú) son muy diversas y que su diversidad está muy concentrada geográficamente (Figura 6). También encontramos una diversidad alta en las poblaciones del sur de Ecuador (población 1) que no se reporta en otros países; las poblaciones del Chocó ecuatoriano presentan características genéticas particulares que no aparecen en otras localidades. Esta información respecto a la distribución geográfica amplia o restringida de la diversidad intraespecífica es fundamental para lograr programas efectivos de manejo y conservación (Koskela *et al.*, 2013). La ocurrencia de diferenciación geográfica en escalas locales indica la importancia de mantener poblaciones en sus diversos hábitats (Lemes *et al.*, 2003). La información generada respecto a diversidad genética puede ser aplicada para el manejo de las poblaciones silvestres (Bailey, 2012) debido a que muestra guías tanto de tamaño poblacional y grado de endogamia.

## **7. Conclusiones y Recomendaciones**

La diversidad genética de *Euterpe precatoria* es más compleja de lo esperado en base a su clasificación taxonómica. La detección de diversidad genética críptica en este estudio abre muchas interrogantes acerca de la evolución y clasificación de *E. precatoria*, pero también ofrece grandes oportunidades para la conservación y el manejo de los recursos genéticos de esta especie.

En la región andina existe un estudio previo que utiliza conceptos de genética de paisaje para el estudio de diversidad silvestre en palmeras (Trenel *et al.*, 2008). Este estudio fue realizado en los andes ecuatorianos para estudiar aislamiento reproductivo

en *Ceroxylon echinulatum*. Nuestro estudio se desarrolla en un espacio geográfico más grande y utiliza un mayor número de muestras y más información genética. En este sentido es un estudio pionero en Arecaceas en el Neotrópico, y la información arrojada es relevante tanto a nivel local como regional.

Debido a que existen importantes discontinuidades de muestreo sobre la distribución de la especie, se recomienda completar esta distribución con muestras de Brasil y Centroamérica para complementar el conocimiento acerca de la distribución de la diversidad en *E. precatória*. Cabe recalcar que en este estudio únicamente analizamos simpatría entre dos de los tres grupos genéticos encontrados, y que el aislamiento genético entre los tres grupos es similar. Esto abre la pregunta de si existe o no intercambio genético entre los dos grupos de *E. precatória* var. *precatória*.

La información obtenida es una importante evidencia que soporta la hipótesis de que *longevaginata* es una especie diferente de *precatória*. A la luz de estos resultados aconsejamos revisar la taxonomía de *Euterpe* mediante más estudios de filogenia, morfología y fenología para aclarar el estatus taxonómico de las poblaciones caracterizadas.

## 8. Literatura citada

- Bailey, J. K., Genung, M. A., O'Reilly-Wapstra, J., Potts, B., Rowntree, J., Schweitzer, J. A. y Whitham, T. G. 2012. New frontiers in community and ecosystem genetics for theory, conservation, and management. *New Phytologist*, 193(1): 24-26.
- Bardford, A., Hagen, M. y Borschenius, F. 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany*, 108(8): 1503-1516.
- Bickford, D., Lohman, D.J., Sodhi, N.S., Ng, P.K.L., Meier, R., Winker, K., Ingram K.K. y Das, I. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 148–155.
- Booy, G., Hendriks, R.J.J., Smulders, M.J.M., Van Groenendael, J.M. y Vosman, B. 2000. Genetic diversity and the survival of populations. *Plant Biology*, 2: 379–395.
- Bowen, B. W., Nelson, W. S., y Avise, J. C. 1993. A molecular phylogeny for marine turtles: trait mapping, rate assessment, and conservation relevance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(12): 5574-5577.
- Cellinese, N., Baum, D., y Mishler, B. 2012. Species and Phylogenetic nomenclature. *Systematic Biology*, 61(5): 885-891.
- Chevenet, F. , Brun, C., Bañuls, A. L., Jacq y B., Christen, R. 2006. TreeDyn: Towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics Vol 7*: 439.

- John, R., Dalling, J. W., Harms, K. E., Yavitt, J. B., Stallard, R. F., Mirabello, M., Hubbell, S.P., Valencia, R., Navarrete, H., Vallejo, M. y Foster, R. B. 2007. Soil nutrients influence spatial distributions of tropical tree species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3): 864-869.
- D'Orbigny, A. D. 1836. *Voyage dans l' Amerique méridionale (le Bre'sil, la République Orientale de l'Uruguay, la République Argentine, la Patagonie, la République du Chili, la République de Bolivia, la République du Pérou)*, executé pendant les années 1826, 1827, 1828, 1829, 1830, 1831, 1832, et 1833. Chez P. Bertrand, Paris, 1847. 2(2):1-52.
- DeHayes, D.H., Jacobson Jr., G.L., Schaberg, P.G., Bongarten, B., Iverson, L., y Dieffenbacher-Krall, A.C. 2000. Forest responses to changing climate: lessons from the past and uncertainty for the future. en R.A. Mickler, R.A Birdsey and J.L Hom (eds.), *Responses of northern U.S. forests to environmental change*. Springer-Verlag, NY. 495- 539.
- DeSalle, R y Amato, G. 2004. The expansión of Conservation Genetics. *Nature*, 5: 703-712.
- Escudero, A., Iriondo, J.M. y Torres, M.E. 2003 Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biological Conservation*, 113: 351-365.
- Evanno, G., Regnaut, S. y Goudet, J. 2005. Detecting the number of Grupos of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2612
- Felsenstein, J. 2005 . PHYLIP (Phylogeny inference package), version 3.6. Computer program distributed by the author, Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington, USA.

- Feulner, P.G.D., Kirschbaum, F., Schugardt, C., Ketmaier, V., y Tiedemann, R. 2006. Electrophysiological and molecular genetic evidence for sympatrically occurring cryptic species in African weakly electric fishes (Teleostei: Mormyridae: *Campylomormyrus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39(1): 198-208.
- Fine, P.A., Daly, D.C., y Cameron, K.M. 2005. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of burseracear trees in the western Amazon. *Evolution*, 59(7): 1464-1478.
- Frankel, O.H., Brown, A.H.D. y Burdon, J. 1995. The genetic diversity of wild plants. En: Frankel O.H., Brown A.H.D., Burdon J, eds. *The conservation of plant biodiversity*, Cambridge University Press, UK. Primera edición: 10–38.
- Frankham, R. 2005. Genetics and Extinction. *Biological Conservation*, 126(2): 131–140.
- Frankham, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics*, 11: 661–663.
- Frankham, R., Dallou, J., Dudash, M., Eldridge, M., Fenster, C., Lacy, R., Mendelson, J., Porton, I., Ralls, K. y Ryder, O. 2012. Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*, 153: 25-31.
- Gaiotto ,F.A., Brondani, R.P.V. y Grattapaglia, D. 2001. Microsatellite markers for heart of palm—*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology*, 1: 86–88.

- Grundt, H. H., Kjølner, S., Borgen, L., Rieseberg, L. H., y Brochmann, C. 2006. High biological species diversity in the arctic flora. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(4): 972-975.
- Hebert, P. D., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., y Hallwachs, W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41): 14812-14817.
- Henderson, A. 1995. *The palms of the Amazon*. Oxford University Press.
- Henderson, A. y Galeano, G. 1996. *Euterpe*, *Prestoea*, and *Neonicholsonia* (Palmae). *Flora Neotropica* 1-89.
- Henderson, A., Galeano, G. y Bernal, R. 1995. *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton University Press, Princeton.
- Holdegger, R., Buehler, D., Gugerli, F. y Manel, S. 2010. Landscape genetics of plants. *Trends in Plant Science*, 15(12): 675-683.
- Holderegger, R. y Wagner, H.H. 2008. Landscape Genetics. *Biological Science*, 58(3):199-207.
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N. y Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6): 609-623.
- Jensen, J.F., Kvist, L.P. y Christensen, S.B. 2002. An antiplasmodial lignan from *Euterpe precatoria*. *Journal of Natural Products*, 65: 1915-1917.
- Kahn, Francis. 1988. Ecology of economically important palms in Peruvian Amazonia. *Advances in Economic Botany*, 6: 42-49.

- Koskela, J., Lefèvre, F., Schueler, S., Kraigher, H., Olrik, D. C., Hubert, J., Longauer, R., Bozzano, M., Yrjänä, L., Alizoti, P., Rotachi, P., Vietto, L., Bordács, S., Myking, T., Eysteinnsson, Y., Souvannavong, O., Fady, B., De Cuyper, B., Heinze, B., von Wühlisch, G., Ducouso, A. y Ditlevsen, B. 2013. Translating conservation genetics into management: Pan-European minimum requirements for dynamic conservation units of forest tree genetic diversity. *Biological Conservation*, 157: 39-49.
- Kvist, L.P., Andersen M., Hesselsøe M. y Vanclay J.K. 1995. Estimating use-values and relative importance of Amazonian flood plain trees and forests to local inhabitants. *Commonwealth Forestry Review*, 74(4): 293-300.
- Lemes, M. R., Gribel, R., Proctor, J. y Grattapaglia, D. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. *Molecular Ecology*, 12: 2875–2883.
- Lepsch-Cunha, N., Lund, C.A. y 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.J., Gillies, A.C.M., Wilson, J. y Dawson, I.K. 2000. Conservation genetics of bush mango from central/west Africa: implications from random amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular Ecology*, 9: 831–841.
- Ludeña, B., Chabrillange, N., Aberlenc-Bertossi, F., Adam, H., Tregear, J.W. y Puntaud, J.C. 2011. Phylogenetic utility of the nuclear genes *AGAMOUS 1* and *Phytochrome B* in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of Botany*, 108: 1433-1444.

- Macía, M.J., Armesilla, P.J., Cámara-Leret, R., Paniagua-Zambrana, N., Villalba, S., Balslev, H. y Pardo-de-Santayana, M. 2011. Palm Uses in Northwestern South America: A Quantitative Review. *Botanical Review*, 77: 462–570.
- Malhi, Y., Pegoraro, E., Nobre, A.D., Pereira, M.G.P., Grace, J., Culf, A.D. y Clement, R. 2002. Energy and water dynamics of a central Amazonian rain forest. *Journal of Geophysical Research*, 107: 8061.
- McNeely, J. A., Miller, K.R., Reid, W.V., Mittermeier, R.A. y Werner, T.B. 1990. Conserving the world's biological diversity. World Conservation Union, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund–US, and the World Bank, Washington, D.C.
- Montúfar, R. y Barreiro J. M. 2010. Estructuración genética de poblaciones de palmeras en el neotrópico derivado de marcadores microsatélites (SSRs). *Ecología en Bolivia*, 45(3): 30-43.
- Montúfar, R. y Pintaud, J.C. 2008. Estatus taxonómico de *Oenocarpus bataua* (Euterpeae, Arecaceae) inferido por secuencias del ADN cloroplástico. *Revista Peruana de Biología*, 15 (1): 73-78.
- Montúfar, R., Maria, C., Pham, J.L. y Pintaud, J.C. 2007. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes*, 7: 75–78.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-392.
- Negri, A.J., Anagnostou, E.N., y Adler, R F. 2000. A 10-yr climatology of Amazonian rainfall derived from passive microwave satellite observations. *Journal of Applied Meteorology*, 39(1): 42-56.

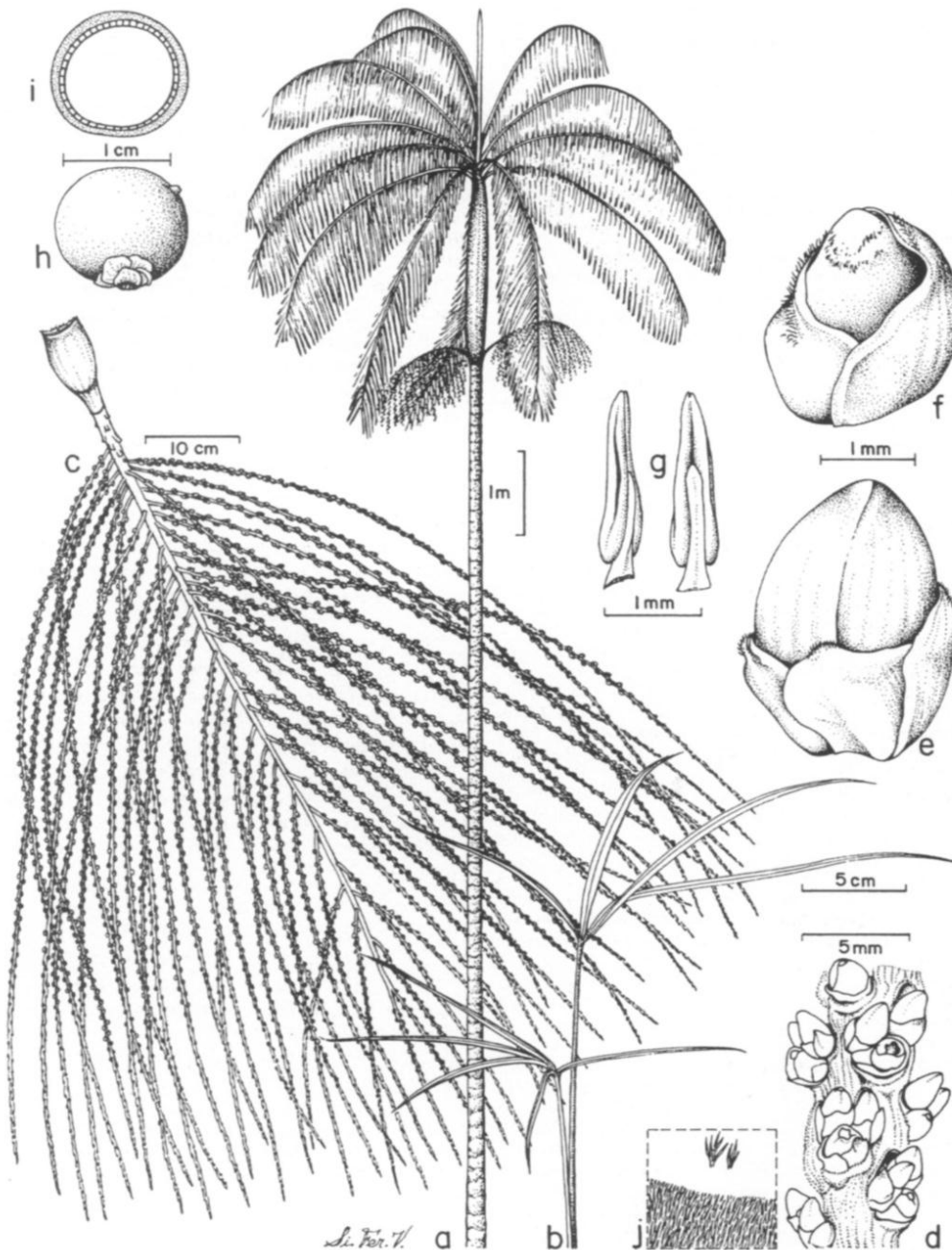
- Pacheco-Palencia, L.A., Duncan, C.E. y Talcott, S.T. 2009. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial açai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. *Food Chemistry*, 115: 1199-1205.
- Palsbøll, J.P., Bérubé, M. y Allendorf, F.W. 2007. Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22(1): 11–16.
- Peakall, R. y Smouse, P.E. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295.
- Peters, C.M. 1994. Sustainable harvest of non-timber plant resources in tropical moist forest. An ecological primer. Washington DC, Biodiversity Support Program.
- Petit, R.J., El Mousadik, A. y Pons, O. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844–855.
- Pintaud, J-C. 2008. An overview of the taxonomy of *Attalea* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología*, 15(1): 55–63.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Ravaoarimanana, I.B., Tiedemann, R., Montagnon, D. y Rumpler, Y. 2004. Molecular and cytogenetic evidence for cryptic speciation within a rare endemic Malagasy lemur, the Northern Sportive Lemur (< i> *Lepilemur septentrionalis*</i>). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(2): 440-448.

- Reed, D.H. y Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17(1): 230-237.
- Rigsby, C. A., Latrubesse, E. M., Baker, P. A. y Silva, C. G. 2010. Reexamining the late Cenozoic geologic evolution of the Amazon basin. AGU Fall Meeting Abstracts, 1: 0704.
- Savolainen, V., Anstett, M.C., Lexer, C., Hutton, I., Clarkson, J.J., Norup, M.V., Powell, M.P., Springate, D., Salamin, N. y Baker, W.J. 2006. Sympatric speciation in palms on an oceanic island. *Nature*, 441: 210–213.
- Shanley, P., Pierce A.R., Laird S.A., y Guillén, A. 2002. Tapping the green market. Earthscan Publications Ltd.
- Shoemaker, J.S., Painter, I.S. y Weir, B.S. 1999 Bayesian statistics in genetics: a guide for the uninitiated. *Trends In Genetics*, 15: 354–358.
- Smouse, P.E. y Peakall, R. 1999. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*, 82: 561-573.
- Soares, T.N., Chaves, L.J. de Campos-Telles, M., Diniz.Filho, A.F. y Resende, L.V. 2008. Landscape conservation genetics of *Dipterix alata* (“brau” tree: Fabaceae) from Cerrado region of central Brazil. *Genetica*, 132(1): 9-19.
- Sork, V.L. y Smouse, P.E. 2006. Genetic analysis of landscape connectivity in tree populations. *Landscape Ecology*, 21(6): 821-836.
- Stoian, D. 2004. Todo lo que sube tiene que bajar: La economía del palmito (*Euterpe precatoria*) en el norte amazónico de Bolivia. En N. Alexiades y P. Shanley (ed.) *Productos Forestales, Medios de Subsistencia y Conservación.*, 3, América Latina. CIFOR, Bogor, Indonesia. Páginas: 117-140.

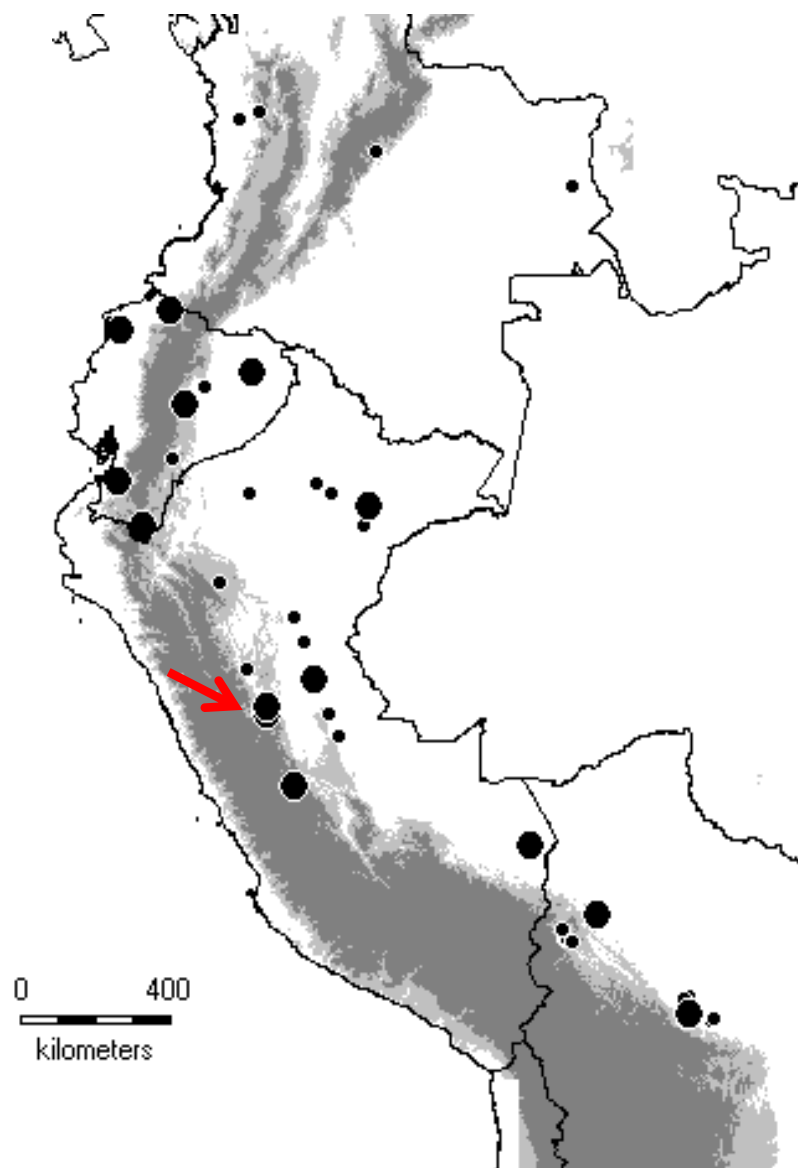
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spear, S.F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierlingand, L. y Waits, L.P. 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics, *Heredity*, 98: 128–142.
- Tassinari, C.C., y Macambira, M.J. 1999. Geochronological provinces of the Amazonian Craton. *Episodes-News magazine of the International Union of Geological Sciences*, 22(3): 174-182.
- Thompson, I., Mackey, B., McNulty, S. y Mosseler, A. 2009. *Forest Resilience, Biodiversity, and Climate Change*. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal. Technical Series no. 43.
- Turril, W.B. 1942. Taxonomy and phylogeny. *The Botanical Review*, 8(8): 473-532.
- Underwood, T.J. y Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, 11(6): 609–623.
- Valencia, R., Balslev, H. y Paz Y Miño C.G. 1994. High tree alpha-diversity in Amazonian Ecuador. *Biodiversity and Conservation*, 3(1): 21-28.
- van Zonneveld, M., Scheldeman, X., Escribano, P., Viruel, M.A., Van Damme, P., García, G., Tapia, C., Romero, J., Siqueñas, M. y Hormaza, J.I. 2012. Mapping Genetic Diversity of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.): Application of Spatial Analysis for Conservation and Use of Plant Genetic Resources. *PLoS ONE* 7(1): e29845. doi:10.1371/journal.pone.0029845
- Vrijenhoek, R.C., Schutz, S.J., Gustafson, R. G. y Lutz, R.A. 1994. Cryptic species of deep-sea clams (Mollusca: Bivalvia: Vesicomidae) from hydrothermal vent and cold-water seep environments. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 41(8): 1171-1189.

- Wesselingh, F.P. y Salo, J.A. 2006. Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133: 439-458
- Wesselingh, F.P., Guerrero, J., Räsänen, M., Romero Pitmann, L. y Vonhof, H. 2006. Landscape evolution and depositional processes in the Miocene Amazonian Pebas lake/wetland system: evidence from exploratory boreholes in northeastern Peru. *Scripta Geologica*, 133: 323-361
- Willemen, L., Scheldeman, X., Soto Cabellos, V., Salazar, S.R. y Guarino, L. 2007. Spatial patterns of diversity and genetic erosion of traditional cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivation in the Peruvian Amazon: An evaluation of socioeconomic and environmental indicators. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 54: 1599–1612.
- Zuidema, P.A. y Boot, R.G.A. 2000. Demographic constraints to sustainable palm heart extraction from a sub-canopy palm in Bolivia. En: P.A. Zuidema. *Demography Exploited Tree Species in the Bolivian Amazon*. PROMAB, Riberalta.

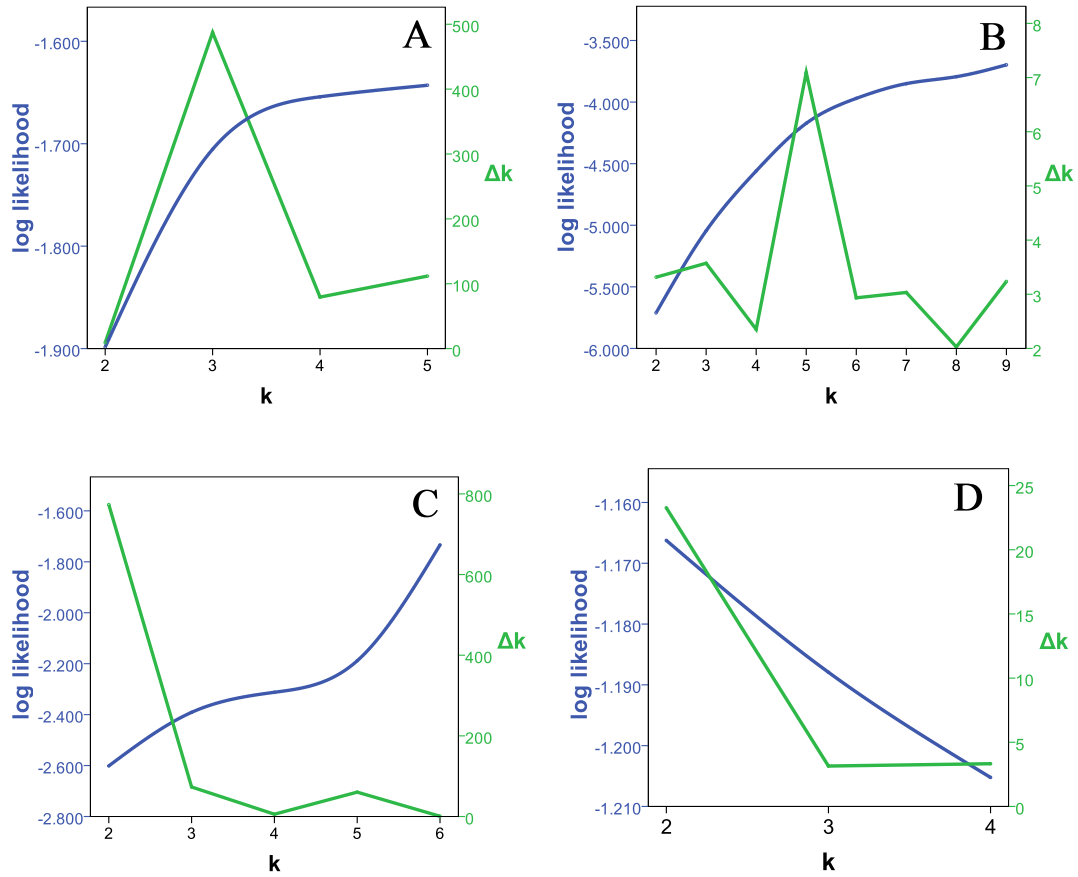
## **9. Figuras**



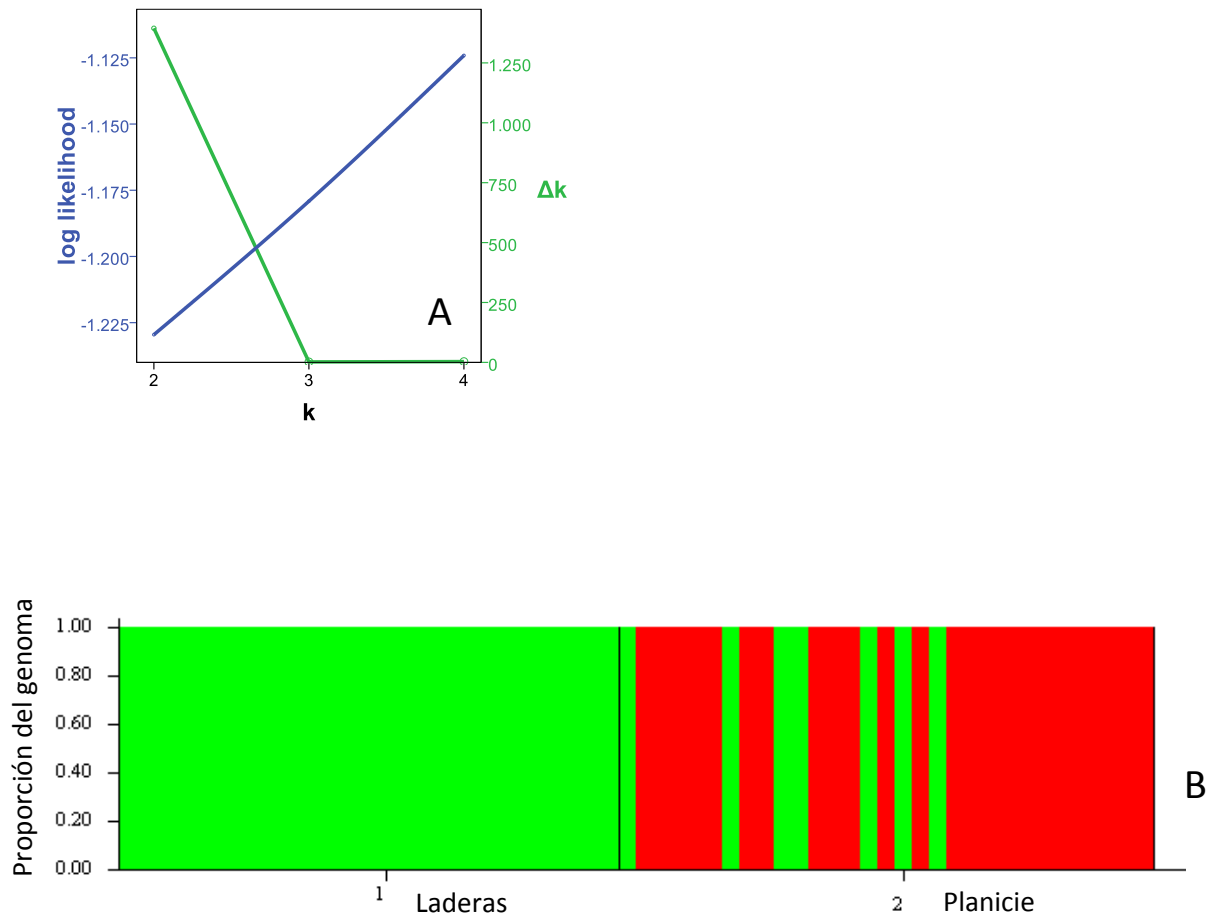
**Figura 1.** Morfología de *Eutperpe precatória*. a. Hábito. b. Juvenil. c. Inflorescencia. d. Parte de la raquilla. e. Flor estaminada. f. Flor pestilada. g. Estambre. h. Fruto. i. Sección de fruto. j. detalle de los tricomas de la raquilla. Tomado de Henderson y Galeano, 1996.



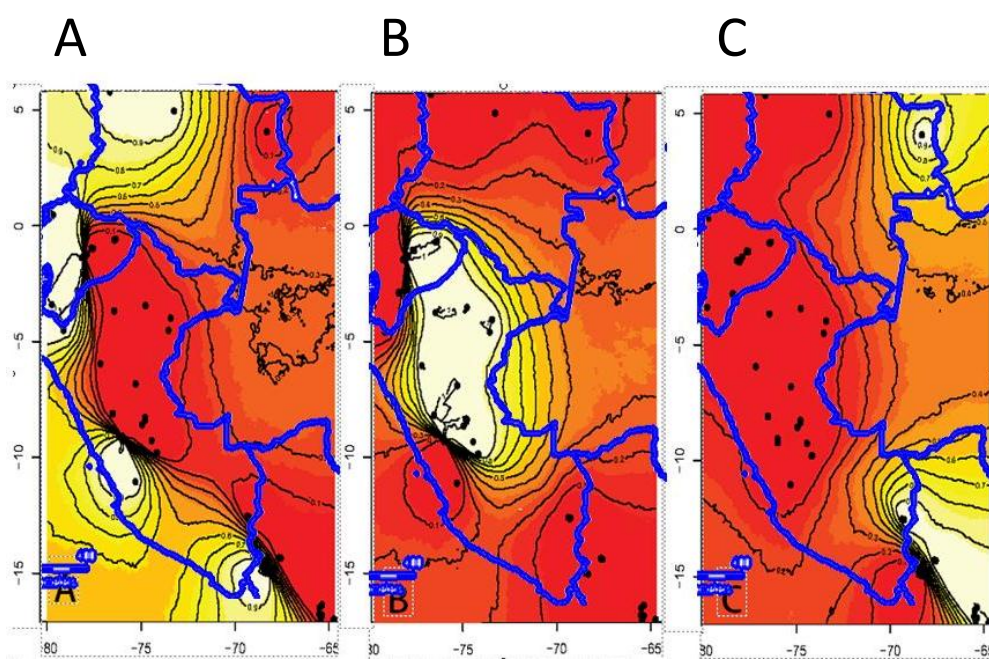
**Figura 2.** Localidades muestreadas. Los puntos grandes representan lugares donde se colectaron 25 o más muestras de *E. precatória*. Los puntos pequeños son sitios donde se colectó al menos un individuo. La flecha roja indica la localidad de Tingo María, Perú.



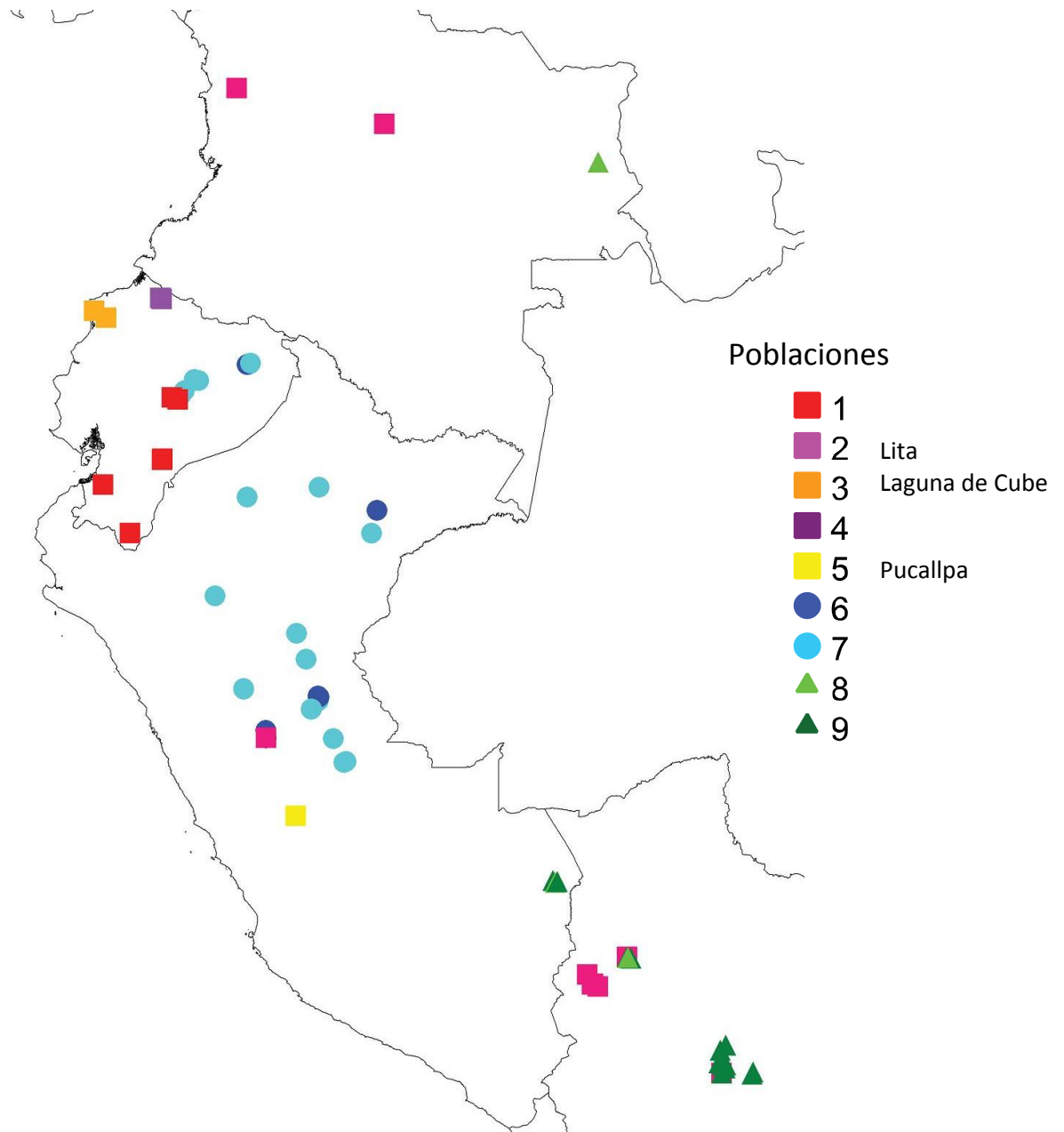
**Figura 3.** Logaritmo de la probabilidad posterior y  $\Delta k$  vs. el número de poblaciones estimadas ( $k$ ) de: todas las localidades (A), Grupo 1(B), Grupo 2 (C) y Grupo 3 (D).



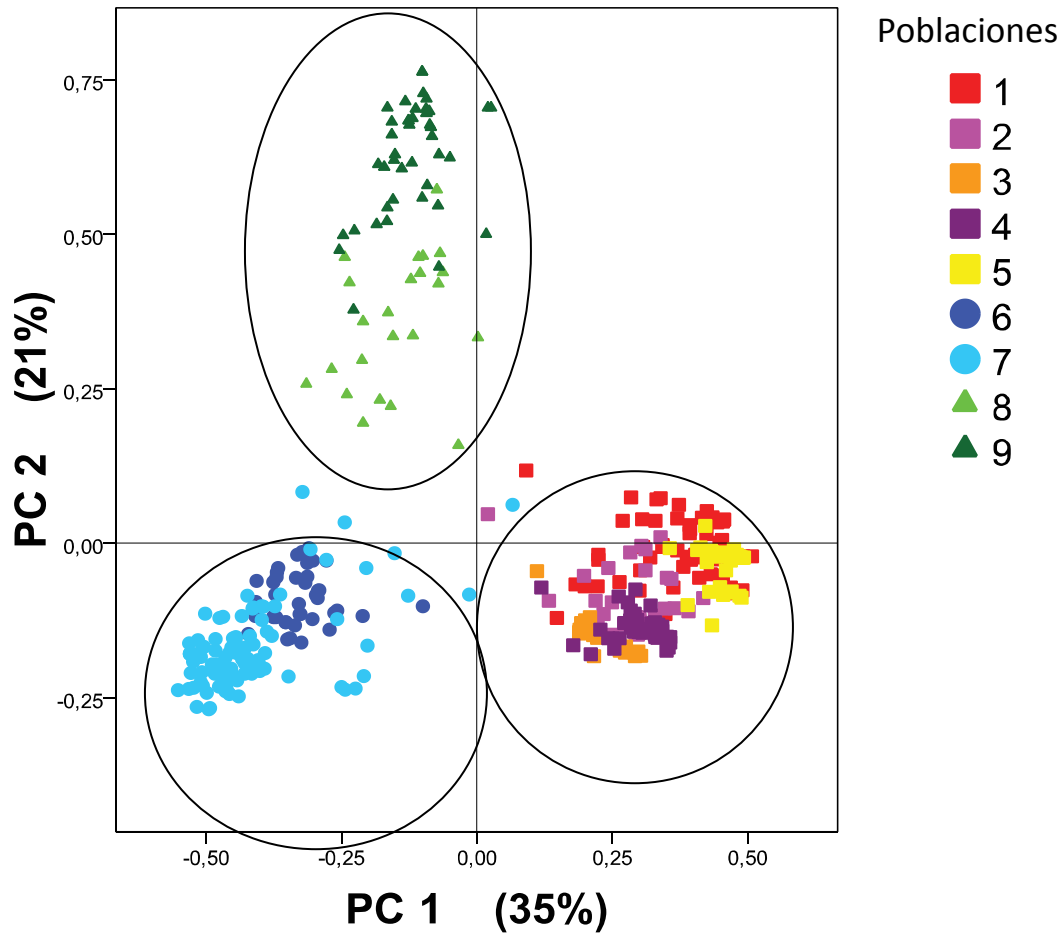
**Figura 4.** A: Logaritmo de la probabilidad posterior y delta  $k$  vs el número de poblaciones estimadas en STRUCTURE de las muestras en la región de simpatria. B: Asignación poblacional del genotipo de individuos colectados en la región de simpatria a una de las dos poblaciones determinadas. Los números en el eje x indican las localidades de las que provenían las muestras. El color rojo indica genotipo asociado a *E. precatoria* var. *precatoria*, mientras que el verde indica genotipo asociado a *E. precatoria* var. *longevaginata*. En la localidad 2 existen dos grupos discretos sin hibridación.



**Figura 5.** Mapas de probabilidad generados en GENELAND. Las zonas más rojas indican alta probabilidad de pertenencia; las zonas claras indican baja probabilidad de pertenencia. A = probabilidad de pertenecer al grupo 1 (*longevaginata*). B = probabilidad de pertenecer al grupo 2. C = probabilidad de pertenecer al grupo 3. Los puntos geográficos corresponden a los de la Figura 1.



**Figura 6.** Distribución geográfica de las muestras de *E. precatória*, los grupos y las poblaciones. Los cuadrados indican el grupo 1 (*E. precatória* var. *longevaginata*); los círculos, el grupo 2 (*E. precatória* var. *precatória*); y los triángulos indican el grupo 3 (*E. precatória* va. *precatória*). Cada color identifica a una población dentro de un grupo.



**Figura 7.** Análisis de Coordenadas Principales de todas las muestras. Los círculos agrupan a los tres grupos principales. El grupo 1 (*E. precatória* var. *longevaginata*) aparece a la derecha del gráfico. Los cuadrados indican muestras del grupo 1; los puntos, muestras del grupo 2; y los triángulos, muestras del grupo 3. Cada color identifica a una población dentro de un grupo.

## Porcentajes de Varianza Molecular

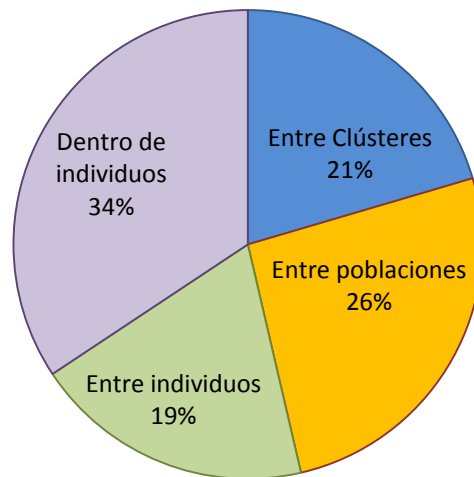
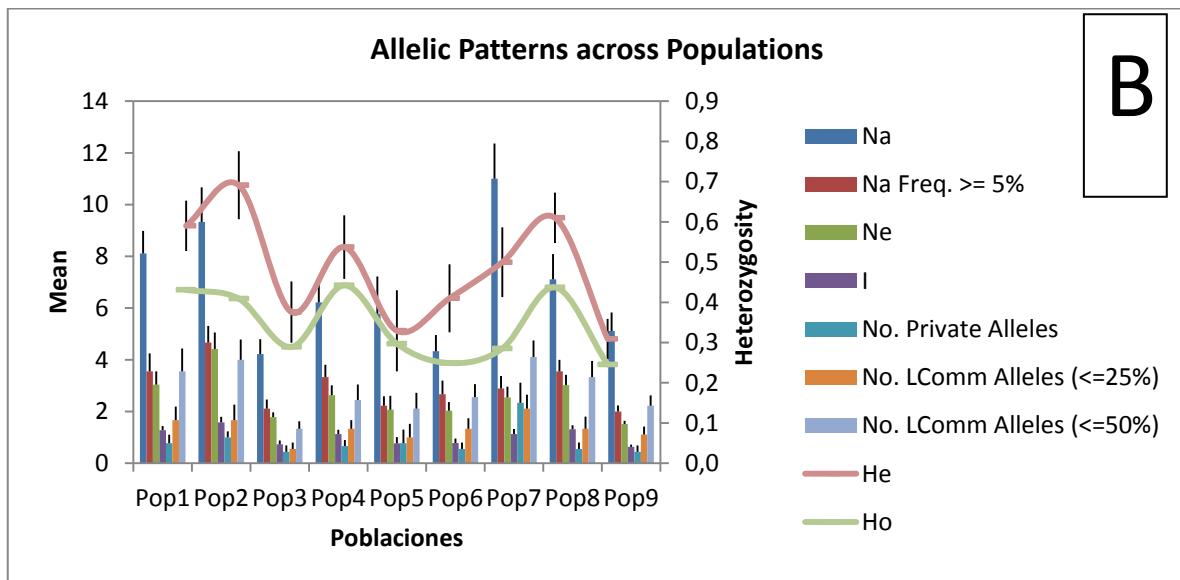
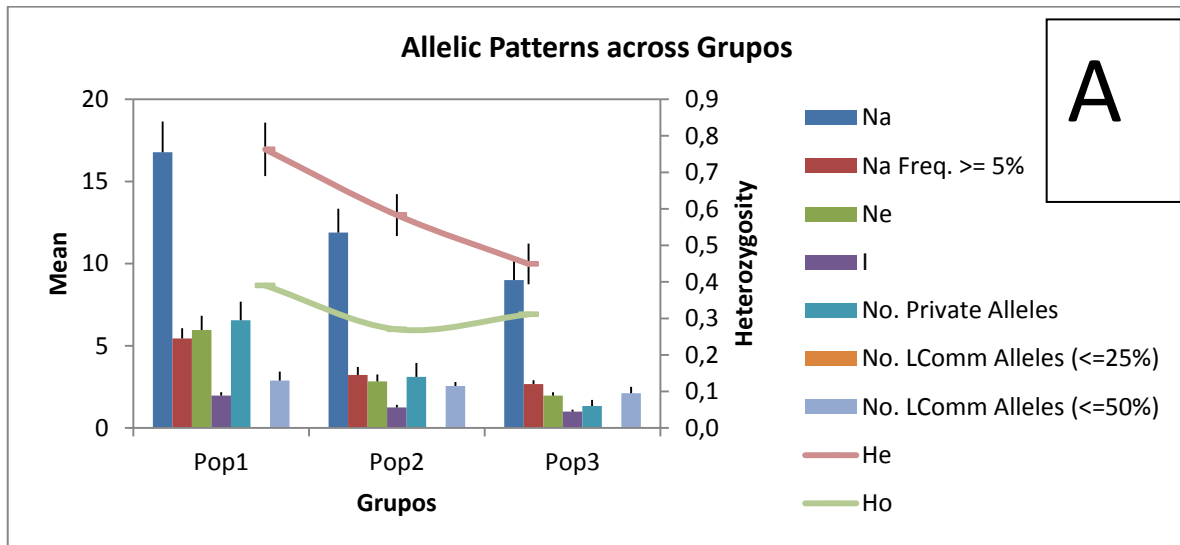


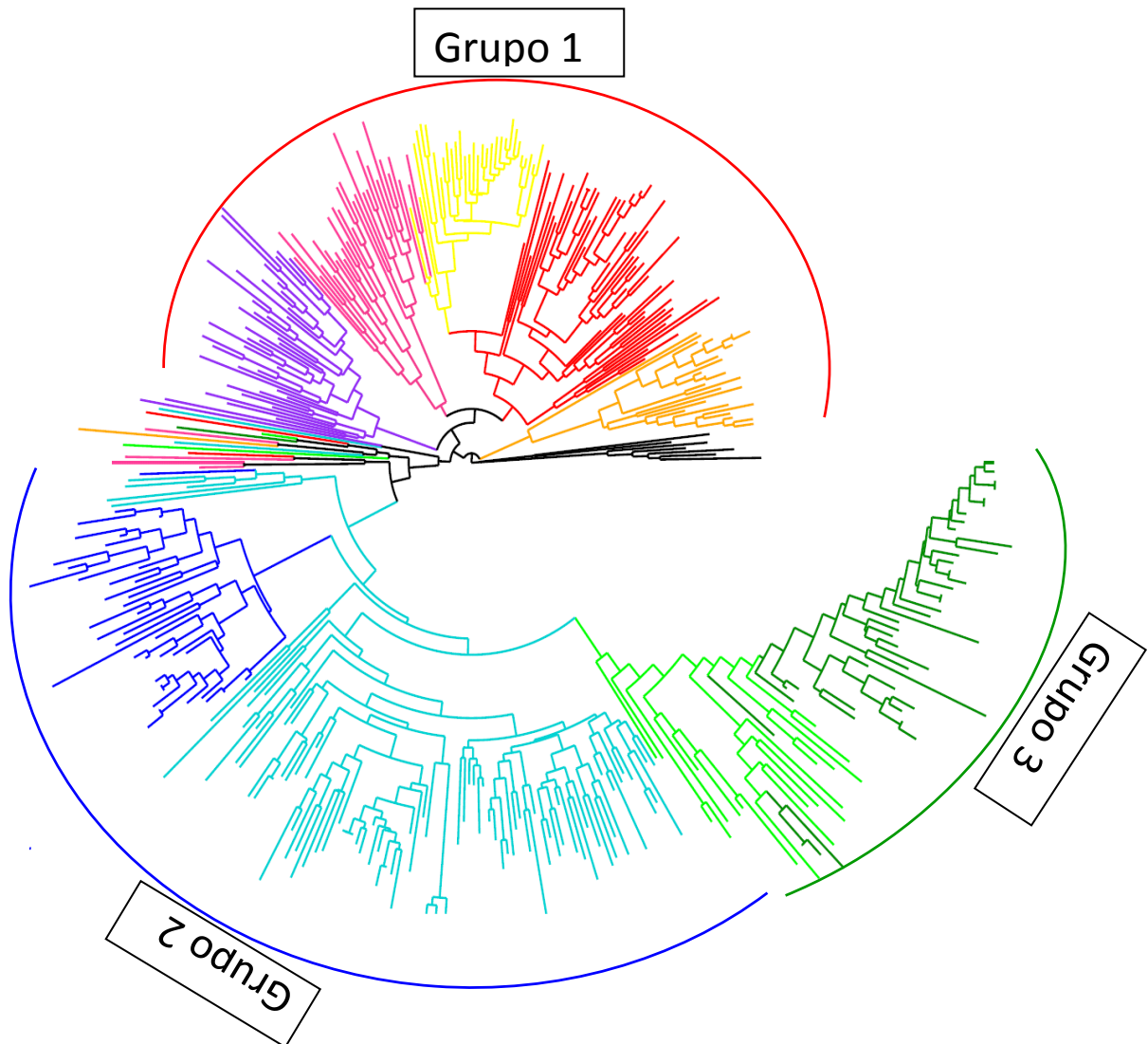
Tabla de AMOVA

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre Grupos	2	667,238	333,619	0,879	20%
Entre Poblaciones	6	545,396	90,899	1,115	26%
Entre Individuos	386	1211,221	3,138	0,831	19%
Dentro de Individuos	395	583,000	1,476	1,476	34%
<b>Total</b>	<b>789</b>	<b>3006,856</b>		<b>4,301</b>	<b>100%</b>

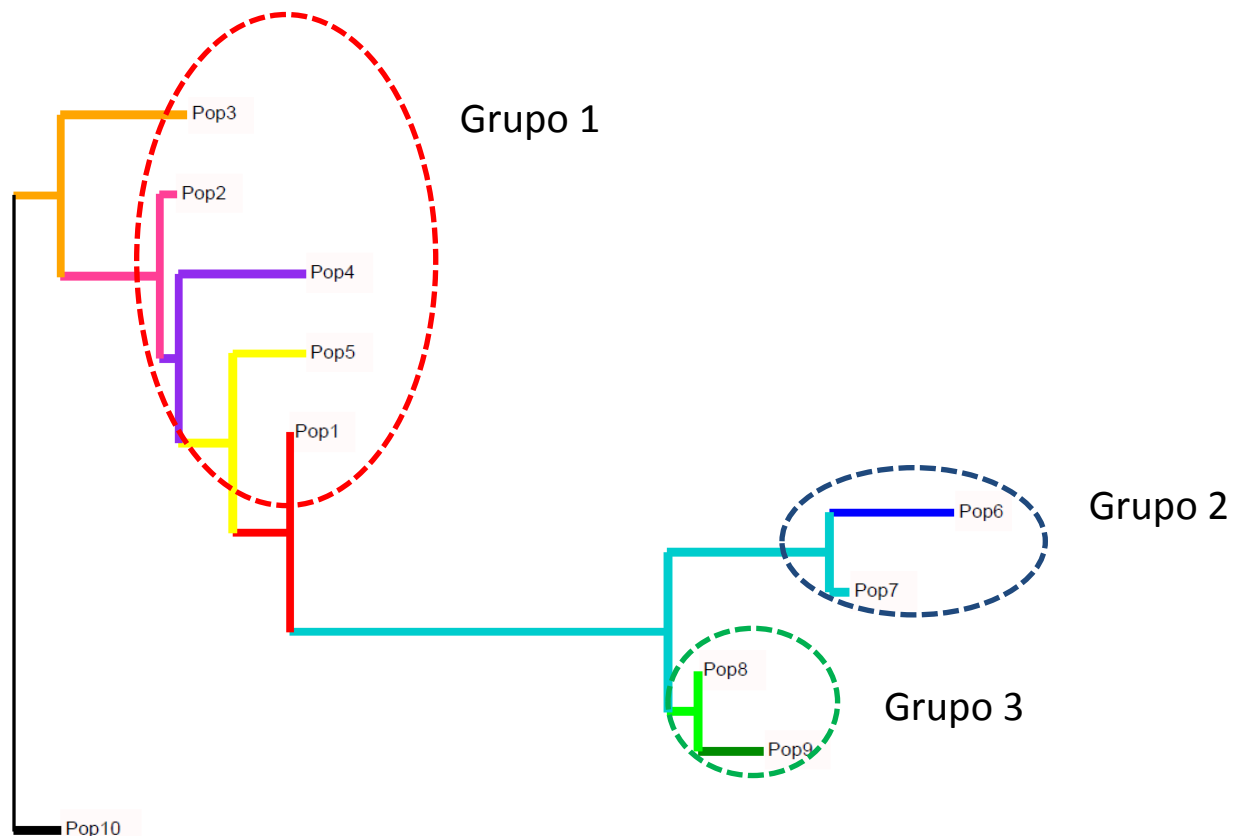
**Figura 8.** AMOVA de todas las muestras de *E. precatoria* y todos los loci. Se analizó la distribución de la varianza entre grupos, Poblaciones, individuos, y dentro de individuos.



**Figura 9.** A: Patrón alélico entre los grupos principales de *E. precatória*. B: Patrón alélico entre las poblaciones. Número de alelos (Na), Número de alelos efectivos (Ne), Índice de información de Shanon (I), Número de alelos únicos (No. Private Alleles), Número de alelos comunes (No. LComm Alleles), Heterocigocidad Esperada (He) y Heterocigocidad observada (Ho). La población 2 corresponde a la localidad de Lita (Ecuador); la población 5, a Pucallpa (Perú).



**Figura 10.** Neighbour Joining de todas las muestras. Se observan los tres grupos y las nueve poblaciones. Los colores de las poblaciones corresponden a los de las Figuras 6 y 7. El grupo externo está pintado de negro.



**Figura 11.** Neighbour Joining de las poblaciones de *E. precatória* estimado mediante la distancia genética entre los grupos y las poblaciones.

## **10. Tablas**

**Tabla 1.** Cebadores utilizados en el estudio

Locus	Repeat array	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	GenBank Accession no.	Dye	Multiplex	Reference
AC5-3#4	CT/GT	F: ACTGTCTGCAGACAATCGAC R: CTTTTGACACCATTAGTCTGC	181-237	AY262720	VIC	1	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003
AG5-5#1	GA	F: TGGTTATGAATCTTAGCCTC R: AAATCCATGCTCCATAGTCC	172-194	AY262729	NED	1	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2003
AG1	TC/GA	F: AGGAGTTGGAGCTGCAAAATGACA R: TGTTTCCGCAAAAGCTGCTTCTCA	89-164	AY739698	6-FAM	1	Ludeña <i>et al.</i> , 2011
CUC3		F: CKTGGACTCATGACTCGCATGTCC R: GGCCTTGCCGGTGGCCTTC	323-375		PET	1	Unpublished data
Ee59	AG	F: AACCTCTCTTTGGCCTA R: CTTGGCATACTGGAACC	82-146	AF328885	PET	1	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001
Ee63	AG	F: CCGATATGCTCAAATCAATG R: ACGAGAGGAATCAAAGAACC	88-127	AF328889	VIC	2	Gaiotto <i>et al.</i> , 2001
Ob2	GA/CA	F: CTGAACCTTATCCCAACTGA R: CACATAACTTTTCAGGCACA	89-149	DQ455753	6-FAM	2	Montúfar <i>et al.</i> , 2007
Ob6	GA	F: GGATTGCATGTGTTTCATTTA R: TTACGCAATGTTTTATTTGG	165-199	DQ455757	VIC	2	Montúfar <i>et al.</i> , 2007
Ob8	GA/T	F: GAGGAGGAATTCTTTCCATT R: AGCCATTAATAATTCATGCAC	-	DQ455759	PET	2	Montúfar <i>et al.</i> , 2007
Ob16	GA	F: AGGTCTAATGATGGAAGCTG R: ACACAGAGACAAACATGTGC	102-173	DQ455767	NED	2	Montúfar <i>et al.</i> , 2007

**Tabla 2.** Valores de  $F_{ST}$  en pares de grupos de *E. precatoria*. Los  $F_{ST}$  entre pares poblaciones aparecen bajo la diagonal;  $F_{ST}$  entre pares de grupos, sobre la diagonal.

	Grupo 1					Grupo 2		Grupo 3		
<b>Pop1</b>	-									
<b>Pop2</b>	0,176	-								
<b>Pop3</b>	0,419	0,328	-			0,294		0,316		<b>Grupo 1</b>
<b>Pop4</b>	0,305	0,245	0,461	-						
<b>Pop5</b>	0,295	0,327	0,580	0,460	-					
<b>Pop6</b>	0,461	0,423	0,570	0,497	0,607	-		0,364		<b>Grupo 2</b>
<b>Pop7</b>	0,424	0,379	0,501	0,446	0,533	0,330	-			
<b>Pop8</b>	0,326	0,288	0,463	0,387	0,489	0,339	0,295	-		
<b>Pop9</b>	0,469	0,462	0,632	0,544	0,635	0,563	0,466	0,141	-	<b>Grupo 3</b>
	<b>Pop1</b>	<b>Pop2</b>	<b>Pop3</b>	<b>Pop4</b>	<b>Pop5</b>	<b>Pop6</b>	<b>Pop7</b>	<b>Pop8</b>	<b>Pop9</b>	

**Tabla 3.** Estadísticos descriptivos de las muestras de *E. precatoria* en la región de simpatria, Tingo María, Perú.

Pop		n	Na	Ne	Ho	He	Fis
<i>longevaginata</i>	Mean	31	5,778	3,202	0,438	0,608	0,290
	SE		0,983	0,462	0,078	0,082	0,085
<i>precatoria</i>	Mean	29	5,333	2,048	0,203	0,415	0,362
	SE		0,957	0,364	0,041	0,073	0,141
<b>Total</b>	Mean	60	5,556	2,625	0,320	0,511	0,328
	SE		0,668	0,318	0,051	0,058	0,082

**Tabla 4.** Estadísticos descriptivos de los tres Grupos de *E. precatória* definidos mediante Structure.

<b>Grupo</b>		<b>n</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Fis</b>
<b>Grupo 1</b>	<b>Mean</b>	190	16,778	5,964	0,390	0,763	0,472**
	<b>SE</b>		1,869	0,868	0,042	0,073	0,037
<b>Grupo 2</b>	<b>Mean</b>	139	11,889	2,836	0,274	0,583	0,522**
	<b>SE</b>		1,457	0,419	0,051	0,057	0,091
<b>Grupo 3</b>	<b>Mean</b>	66	9,000	1,972	0,311	0,449	0,307**
	<b>SE</b>		1,280	0,199	0,038	0,056	0,045
<b>Total</b>	<b>Mean</b>	395	12,556	3,591	0,325	0,598	0,434**
	<b>SE</b>		1,068	0,461	0,026	0,043	0,039

**Tabla 5.** Estadísticos descriptivos de las poblaciones de *E. precatória*.

<b>Grupo</b>		<b>n</b>	<b>Na</b>	<b>Ne</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Fis</b>
<b>Pop1</b>	<b>Mean</b>	55	8,111	3,038	0,431	0,590	0,283
	<b>SE</b>		0,873	0,515	0,062	0,063	0,045
<b>Pop2</b>	<b>Mean</b>	38	9,333	4,421	0,409	0,691	0,365
	<b>SE</b>		1,333	0,635	0,054	0,084	0,058
<b>Pop3</b>	<b>Mean</b>	25	4,222	1,783	0,289	0,376	0,362
	<b>SE</b>		0,572	0,188	0,085	0,076	0,156
<b>Pop4</b>	<b>Mean</b>	41	6,222	2,629	0,442	0,537	0,259
	<b>SE</b>		0,878	0,386	0,083	0,079	0,113
<b>Pop5</b>	<b>Mean</b>	31	5,778	2,070	0,297	0,329	0,098
	<b>SE</b>		1,441	0,536	0,097	0,101	0,057
<b>Pop6</b>	<b>Mean</b>	40	4,333	2,034	0,249	0,410	0,432
	<b>SE</b>		0,624	0,331	0,055	0,085	0,112
<b>Pop7</b>	<b>Mean</b>	99	11,000	2,546	0,285	0,499	0,465
	<b>SE</b>		1,364	0,416	0,054	0,087	0,054
<b>Pop8</b>	<b>Mean</b>	23	7,111	3,023	0,437	0,610	0,274
	<b>SE</b>		0,978	0,397	0,056	0,063	0,063
<b>Pop9</b>	<b>Mean</b>	43	5,111	1,519	0,245	0,309	0,194
	<b>SE</b>		0,716	0,125	0,039	0,050	0,085

## **11. Anexos**

## 11.1. Anexo 1.

Protocolo de extracción del kit DNeasy Plant Minikit de Qiagen.

### Protocol for Isolation of DNA from Plant Tissue with the DNeasy Plant Mini Kit

#### Important notes before starting

- If using DNeasy Plant Mini Kits for the first time please read “Technical Information” (page 11).
- Buffers AP1 and AP3/E concentrate may form precipitates upon storage. If necessary, warm to 65°C to redissolve (before adding ethanol to Buffer AP3/E). Do not heat Buffer AP3/E after ethanol has been added
- Buffer AP1 may develop a yellow color upon storage. This does not affect the procedure.
- Buffers AW and AP3/E are supplied as concentrates. Before using for the first time, add the appropriate amount of ethanol (96–100%) as indicated on the bottle to obtain a working solution.
- Preheat a water bath or heating block to 65°C.
- Preheat Buffer AE to 65°C.
- All centrifugation steps are carried out at room temperature in a microcentrifuge.

1. **Grind plant or fungal tissue under liquid nitrogen to a fine powder using a mortar and pestle. Transfer the tissue powder and liquid nitrogen to an appropriately sized tube and allow the liquid nitrogen to evaporate. Do not allow the sample to thaw. Continue immediately with step 2.**

**Note:** See “Disruption of plant material” (page 11).

2. **Add 400 µl of Buffer AP1 and 4 µl of RNase A stock solution (100 mg/ml) to a maximum of 100 mg of ground (wet weight) or 20 mg (dried) plant or fungal tissue and vortex vigorously.**

No tissue clumps should be visible. Vortex or pipet further to remove any clumps. Clumped tissue will not lyse properly and will therefore result in a lower yield of DNA. In the rare case where clumps cannot be removed by pipetting and vortexing, a disposable micropestle may be used.

**Note:** Do not mix Buffer AP1 and RNase A prior to use.

3. **Incubate the mixture for 10 min at 65°C. Mix 2–3 times during incubation by inverting tube.**

This step lyses the cells.

**4. Add 130 µl of Buffer AP2 to the lysate, mix, and incubate for 5 min on ice.**

This step precipitates detergent, proteins, and polysaccharides.

**(Optional) Centrifuge the lysate for 5 min at full speed.**

Some plant materials can generate very viscous lysates and large amounts of precipitates during this step resulting in shearing of the DNA in the next step (see “Lysate filtration with QIAshredder”, page 12). In this case optimal results are obtained if the majority of these precipitates are removed by centrifugation for 5 min at maximum speed. After centrifugation, apply supernatant to QIAshredder spin column and continue with step 5.

**5. Apply the lysate to the QIAshredder spin column (lilac) sitting in a 2 ml collection tube and centrifuge for 2 min at maximum speed.**

It may be necessary to cut the end off the pipette tip to apply the lysate to the QIAshredder column. QIAshredder removes most precipitates and cell debris, but a small amount will pass through and form a pellet in the collection tube. Be careful not to disturb this pellet in step 6.

**6. Transfer flow-through fraction from step 5 to a new tube (not supplied) without disturbing the cell-debris pellet.**

Typically 450 µl of lysate is recovered. For some plant species less lysate is recovered. In this case determine volume for the next step.

**7. Add 1.5 volumes of Buffer AP3/E to the cleared lysate and mix by pipetting.**

Example: To 450 µl lysate add 675 µl Buffer AP3/E. Reduce the amount of Buffer AP3/E accordingly if less lysate is recovered. A precipitate may form after the addition of ethanol but this will not affect the DNeasy procedure.

**Note:** Ensure ethanol has been added to Buffer AP3/E (see “Important notes before starting”).

**Note:** It is important to pipet Buffer AP3/E directly onto the cleared lysate and to mix immediately.

**8. Apply 650 µl of the mixture from step 7, including any precipitate which may have formed, to the DNeasy mini spin column sitting in a 2 ml collection tube (supplied). Centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (corresponds to  $\geq 8000$  rpm for most microcentrifuges) and discard flow-through.\***

Reuse the collection tube in step 9.

**9. Repeat step 8 with remaining sample. Discard flow-through\* and collection tube.**

**10. Place DNeasy column in a new 2 ml collection tube (supplied), add 500 µl Buffer AW to the DNeasy column and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm). Discard flow-through and reuse the collection tube in step 11.**

**Note:** Ensure ethanol is added to Buffer AW (see page 15).

\* Flow-through fractions contain Buffer AP3/E, and are therefore not compatible with bleach.

**11. Add 500 µl Buffer AW to the DNeasy column and centrifuge for 2 min at maximum speed to dry the membrane.**

It is important to dry the membrane of the DNeasy column since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This spin ensures that no residual ethanol will be carried over during elution. Discard flow-through and collection tube.

After washing with Buffer AW, the DNeasy mini spin column membrane is usually only slightly colored. In the rare case that the membrane remains significantly colored after washing with Buffer AW, refer to “Darkly colored membrane” in the Troubleshooting Guide on page 21.

**Note:** Following the spin, remove the DNeasy column from the collection tube carefully so the column does not contact the flow-through as this will result in carryover of ethanol.

**12. Transfer the DNeasy column to a 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not supplied) and pipet 100 µl of preheated (65°C) Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate for 5 min at room temperature and then centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  ( $\geq 8000$  rpm) to elute.**

Elution with 50 µl (instead of 100 µl) increases the final DNA concentration in the eluate significantly, but also reduces overall DNA yield. If larger amounts of DNA ( $>20$  µg) are loaded, eluting with 200 µl (instead of 100 µl) increases yield. See “Elution” on page 12.

**13. Repeat elution (step 12) once as described.**

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, the microcentrifuge tube can be reused for the second elution step to combine the eluates.

**Note:** More than 200 µl should not be eluted into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy column will contact the eluate.

## 11.2. Anexo 2.

Protocolo de Amplificación de Microsatélites del kit Multiplex PCR de Qiagen.

### Protocol: Amplification of Microsatellite Loci Using Multiplex PCR

This protocol is optimized for standard multiplex PCR amplification of microsatellite loci. For more advanced applications, such as multiplex reactions with more than 10 products or very low amounts of template, see Appendix F, page 42.

#### Important points before starting

- **Always start with the cycling conditions specified in this protocol.**
- If using an already established multiplex PCR system, use the previously established annealing temperature in combination with the cycling conditions specified in this protocol.
- **Annealing time must be 90 seconds.**
- **Use equal concentrations (0.2  $\mu$ M) of all primers.**
- PCR must start with an **activation step of 15 minutes at 95°C** to activate HotStarTaq DNA Polymerase (see step 7 of this protocol).
- **Optional:** If a thermal cycler with a temperature gradient function can be used, determine the optimal annealing temperature by performing a gradient PCR (see Appendix C, page 36).

#### Procedure

1. **Thaw the 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (if stored at -20°C), template DNA, RNase-free water, and primer mix. Mix the solutions completely before use.**

It is important to mix the solutions completely before use to avoid localized concentrations of salts. Preparing a mixture of all primers avoids pipetting of individual primers for each experiment, reducing pipetting time and increasing reproducibility of results (for preparation of primer mix see Table 2, page 9).

**Table 10. Multiplex PCR Components (Reaction Mix and Template DNA)**

Component	Volume/reaction	Final concentration
<b>Reaction mix</b>		
2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix*	25 $\mu$ l	1x
10x primer mix, 2 $\mu$ M each primer (see Table 2)	5 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M <sup>†</sup>
RNase-free water	Variable	–
<b>Template DNA</b>		
Added at step 4	Variable	$\leq$ 1 $\mu$ g DNA/50 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>50 <math>\mu</math>l<sup>‡</sup></b>	

\* Provides a final concentration of 3 mM MgCl<sub>2</sub>.

<sup>†</sup> A final primer concentration of 0.2  $\mu$ M is optimal for most primer–template systems. However, in some cases using other primer concentrations (0.1–0.3  $\mu$ M) may further improve amplification performance.

<sup>‡</sup> For volumes less than 50  $\mu$ l, the 1:1 ratio of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix to primer mix and template should be maintained.

## 2. Prepare a reaction mix according to Table 10.

The reaction mix typically contains all the components required for multiplex PCR except the template DNA. Prepare a volume of reaction mix 10% greater than that required for the total number of reactions to be performed. For reaction volumes less than 50  $\mu$ l, the 1:1 ratio of QIAGEN Multiplex PCR Master Mix to primer mix and template should be maintained as shown in Table 10.

**Note:** We strongly recommend starting with an initial Mg<sup>2+</sup> concentration of 3 mM as provided by the 2x QIAGEN Multiplex PCR Master Mix.

## 3. Mix the reaction mix thoroughly and dispense appropriate volumes into PCR tubes or plates.

Mix gently, for example by pipetting the reaction mix up and down a few times. Due to the hot start, it is not necessary to keep samples on ice during reaction setup.

## 4. Add template DNA ( $\leq$ 1 $\mu$ g/50 $\mu$ l reaction) to the individual PCR tubes containing the reaction mix.

For multiplex RT-PCR, the volume of cDNA added (from the RT reaction) as template should not exceed 10% of the final PCR volume.

## 5. When using a thermal cycler with a heated lid, do not use mineral oil. Proceed directly to step 6. Otherwise, overlay with approximately 50 $\mu$ l mineral oil.

## 6. Program the thermal cycler according to the manufacturer's instructions.

Optional: If a thermal cycler with a temperature gradient function can be used, determine the optimal annealing temperature by performing a gradient PCR.

Table 11. Microsatellite Cycling Protocol

			Additional comments
<b>Initial activation step:</b>	<b>15 min</b>	<b>95°C</b>	HotStarTaq DNA Polymerase is activated by this heating step.
<b>3-step cycling:</b>			
Denaturation	30 s	94°C	
Annealing	90 s	57–63°C	<b>If a gradient PCR cannot be performed, use 60°C as the starting annealing temperature. If the lowest <math>T_m^*</math> of your primer mixture is below 60°C, use 57°C as starting annealing temperature.</b>
Extension	60 s	72°C	Optimal for targets up to approximately 0.5 kb in length. <sup>†</sup>
Number of cycles	25–40		The number of cycles is dependent on the amount of template DNA and the required sensitivity of your detection method. See Appendix C, page 36 for guidelines.
Final extension:	30 min	60°C	

\*  $T_m$  determined according to the formula:  $T_m = 2^\circ\text{C} \times (\text{number of [A+T]}) + 4^\circ\text{C} \times (\text{number of [G+C]})$ .

† For targets longer than 0.5 kb, an extension time of 90 s may improve performance.

**7. Place the PCR tubes in the thermal cycler and start the cycling program as outlined in Table 11.**

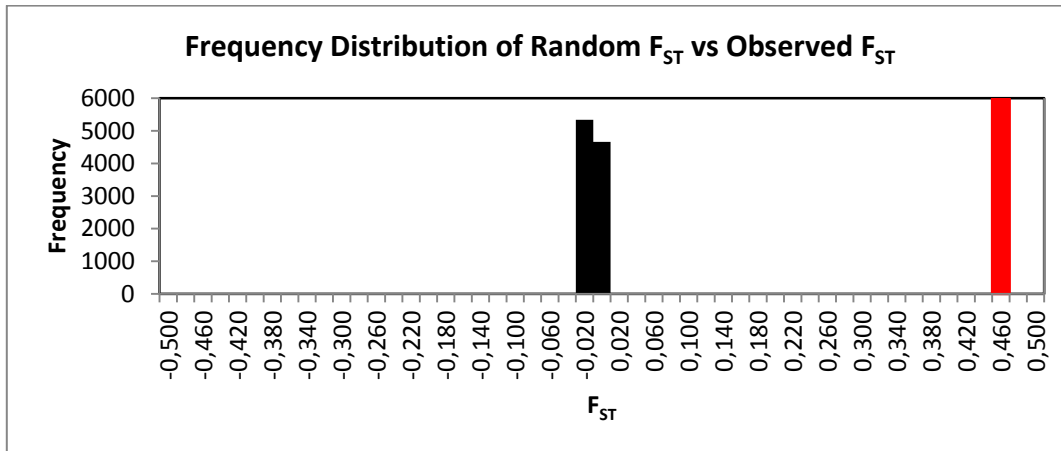
Each PCR program must start with an initial heat-activation step at 95°C for 15 min to activate HotStarTaq DNA Polymerase.

After amplification, samples can be stored overnight at 2–8°C or at –20°C for long-term storage.

**8. Analyze samples using an appropriate detection system, for example automatic gel-based DNA sequencers or those based on capillary electrophoresis.**

The optimal amount of PCR product required to give a satisfactory signal with your detection method should be determined individually.

### 11.3. Anexo 3.



$F_{ST}$  esperados por el azar (negro) versus obtenidos (rojo) en el análisis con 9999 permutaciones. Se toman en cuenta los índices para los tres grupos y las nueve poblaciones

PARA GRADOS ACADÉMICOS DE MAESTRÍAS Y DOCTORADOS PhD

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo, José Manuel Barreiro, C.I. 1708542657, autor del trabajo de graduación intitulado “Estructura genética de *Euterpe precatoria* (Mart.) en los Andes Tropicales”, previa la obtención del grado académico de **MAGISTER EN BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN** 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 al SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea entregado al Sistema Nacional de Información de Educación Superior de 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 de la biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 03 de abril de 2013

Sr. José Manuel Barreiro S.

C.C. 1708542657