

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Variación histórica y espacial de la estructura genética de dos poblaciones de *Ceroxylon echinulatum* Galeano (palma de ramos, Arecaceae) bajo diferentes niveles de impacto humano en el occidente de la Provincia de Pichincha.

**Disertación previa a la obtención del título de Licenciado
en Ciencias Biológicas**

SEBASTIÁN ANTONIO ESPINOZA ULLOA

Quito, 2010

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de Sr. Sebastián Antonio Espinoza Ulloa ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Rommel Montúfar
Director de Disertación

12 de Noviembre del 2010

A mi madre y a mi tía Lolita

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todos los que hicieron que esta tesis se lleve a cabo, a la organización ECOFONDO la cual dio las facilidades económicas haciendo que esta investigación sea posible. Así también agradezco a la PUCE por el apoyo directo e indirecto que tuvo sobre esta investigación, de la misma manera agradezco específicamente al Dr. Rommel Montúfar por su guía, consejo y apoyo, siendo un gran director.

Agradezco de manera muy especial a mi madre, Patricia Ulloa, y a mi tía Lolita, Dolores Espinosa, por sus valiosos consejos, su apoyo incondicional, su amor y su confianza en mí. A Ana Troya y Karina Paredes por su esencial ayuda y su incondicional amistad. A María José Pozo por su apoyo profesional y sentimental, por darme la fuerza para continuar y no desfallecer durante el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros de trabajo Jalil Maiguashca, Diego Morales, Gabriela Pozo, José Manuel Barreiro, Juan Lincango, y Nina Duarte. Así como también a los investigadores asociados del IRD (Institut de recherche pour le développement): Fabien Anthelme, Charllotte Gully y Charllotte Mazoyer (+).

A mis hermanos Joel, Tomás, Juan y Cristina, así también a mis hermanos putativos Daniel, Marco, Roberto C., Roberto E., José, Freddy, Jefferson y Mauricio.

A mis compañeros y amigos de universidad Luís, Oscar, Paola, Andrea, Sofía, Sisimac, Daniel, Jennifer, Ma. Fernanda, Diego, Marcel, Carolina, entre otros.

TABLA DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	V
TABLA DE CONTENIDOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABLAS.....	XI
ANEXOS.....	XII
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. PRINCIPALES ACTIVIDADES HUMANAS Y SUS EFECTOS SOBRE LOS HÁBITATS EN EL NOROCCIDENTE DEL ECUADOR.....	5
3.2. RESEÑA HISTÓRICA DEL EFECTO ANTROPOGÉNICO EN LOS BOSQUES DE LAS ESTRIBACIONES ANDINAS DEL NOROCCIDENTE DE PICHINCHA.....	7
3.3. LAS PALMAS ANDINAS Y SU IMPORTANCIA.....	9
3.4. <i>Ceroxylon echinulatum</i> COMO INDIVIDUO DE ESTUDIO Y COMO UN COMPONENTE IMPORTANTE DEL PAISAJE ANDINO.....	11
3.5. MICROSATÉLITES (SSR's) COMO MARCADOR MOLECULAR.....	15
3.6. LA PROBLEMÁTICA DE <i>Ceroxylon echinulatum</i> Y SUS IMPLICACIONES ECOLÓGICAS.....	15
4. OBJETIVOS.....	18
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	18
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
5.1. ÁREA DE ESTUDIO.....	20
5.2. COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	22
5.3. EXTRACCIÓN DE ADN.....	23
5.4. PRUEBAS PCR Y ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN.....	24
5.5. PRUEBAS DE MICROSATELITES POLIMÓRFICOS Y OBTENCIÓN DE DATOS.....	25
5.6. TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS.....	26
5.7. ANÁLISIS MOLECULARES COMO ESTIMADORES DEL ESTADO ECOLÓGICO DE LAS POBLACIONES E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	27
5.7.1. DESEQUILIBRIO LIGADO.....	28
5.7.2. DIVERSIDAD GENÉTICA.....	29
5.7.3. ESTADÍSTICOS – F	31
5.7.4. DISTANCIA Y RELACIÓN GENÉTICA ENTRE GRUPOS.....	33
5.7.5. COMPARACIONES ENTRE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES.....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS.....	35
6.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN.....	36
6.3. BÚSQUEDA DE MICROSATELITES Y PRUEBAS PCR.....	36
6.4. AMPLIFICACIÓN DE LOCI POLIMÓRFICOS EN TODAS LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS POBLACIONAL.....	37

6.5. TABULACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	38
6.5.1. DESEQUILIBRIO LIGADO E INDEPENDENCIA ENTRE MICROSATÉLITES (LOCI).....	38
6.5.2. CUANTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	39
6.5.3. ANÁLISIS POBLACIONALES, ESTADÍSTICOS – <i>F</i> Y ENDOGAMIA.....	41
6.5.4. COMPARACIONES POBLACIONALES Y DISTANCIA GENÉTICA.....	42
7. DISCUSIÓN.....	44
7.1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE LA RAÍZ.....	44
7.2. EVALUACIÓN DE LA TRANSFERIBILIDAD DE MICROSATÉLITES Y RESULTADOS NEGATIVOS.....	44
7.3. <i>Ceroxylon echinulatum</i> : UN MODELO BIOLÓGICO ACOPLADO AL MODELO TEÓRICO DE HARDY – WEINBERG.....	46
7.4. LA DIVERSIDAD GENÉTICA COMO UN REFLEJO DE LAS INTERACCIONES ECOLÓGICAS Y CONDICIÓN DEL HABITAT.....	47
7.5. NIVELES DE ENDOGAMIA EN LAS POBLACIONES DE <i>Ceroxylon echinulatum</i>	49
7.6. POCAS VARIACIONES EN LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE SUBPOBLACIONES Y POBLACIONES DEBIDO A UN FLUJO GÉNICO TODAVÍA EXISTENTE.....	53
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	57
9. LITERATURA CITADA.....	60
10. FIGURAS.....	69

11.	TABLAS.....	81
12.	ANEXOS.....	85
13.	GLOSARIO.....	102

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. MAPA DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	70
FIGURA 2. EXTRACCIONES DE ADN TOTAL.....	71
FIGURA 3. COMPROBACIÓN DE AMPLIFICACIONES.....	72
FIGURA 4. AMPLIFICACIÓN DEL MICROSATÉLITE <i>Ca13</i> EN UN GEL DE POLIACRILAMIDA.....	72
FIGURA 5. FRECUENCIAS ALÉLICAS PARA CADA MICROSATÉLITE Y SUBPOBLACIÓN.....	73
FIGURA 6. RIQUEZA ALÉLICA POR MICROSATÉLITE Y SUBPOBLACIÓN.....	74
FIGURA 7. VARIACIÓN DE LA RIQUEZA ALÉLICA TOTAL PARA CADA SUBPOBLACIÓN.....	74
FIGURA 8. DIVERSIDAD GÉNICA POR MICROSATÉLITE Y SUBPOBLACIÓN.....	75
FIGURA 9. DIVERSIDAD GÉNICA POR MICROSATÉLITE Y SUBPOBLACIÓN SEPARADAS POR POBLACIÓN.....	76
FIGURA 10. RELACIÓN ENTRE HETEROCIGOTOS ESPERADOS Y OBSERVADO Y COEFICIENTE DE ENDOGAMIA.....	77
FIGURA 11. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA) BASADO EN EL ÍNDICE DE FIJACIÓN (F_{st}).....	78
FIGURA 12. ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA) BASADO EN LA DISTANCIA GENÉTICA DE NEI.....	79
FIGURA 13. PORCENTAJES EXPLICATIVOS DE LA SIGNIFICACIÓN DEL AMOVA	

ENTRE POBLACIONES.....80

FIGURA 14. PORCENTAJES EXPLICATIVOS DE LA SIGNIFICACIÓN DEL AMOVA
 ENTRE SUBPOBLACIONES.....80

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. LISTADOS DE INDIVIDUOS MUESTREADOS.....	82
TABLA 2. RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE AMPLIFICACIÓN CRUZADA.....	84
TABLA 3. PROTOCOLO ESTANDARIZADO BASADO EN EL PROGRAMA DE GAITÁN (2003).....	85
TABLA 4. PRUEBA DE TRANSFERIBILIDAD DE MICROSATÉLITES HACIA <i>Ceroxylon echinulatum</i>	86
TABLA 5. MATRIZ TRIANGULAR CON LOS VALORES DE p PARA EL DESEQUILIBRIO LIGADO.....	87
TABLA 6. NÚMERO DE ALELOS TOTALES POR POBLACIÓN Y MICROSATÉLITE.....	87
TABLA 7. NÚMERO DE ALELOS POR CADA MICROSATÉLITE Y SUBPOBLACIÓN.....	88
TABLA 8. RIQUEZA ALÉLICA POR MICROSATÉLITE, SUBPOBLACIÓN Y POBLACIÓN.....	88
TABLA 9. RELACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE SUBPOBLACIONES.....	89
TABLA 10. RESULTADOS DEL AMOVA ENTRE SUBPOBLACIONES.....	90
TABLA 11. RESULTADOS DEL AMOVA ENTRE POBLACIONES.....	90

ANEXOS

ANEXO 1. MUESTRAS COLECTADAS EN EL CAMPO.....	92
ANEXO 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN VEGETAL (INVITROGEN).....	94
ANEXO 3. PREPARACIÓN DE GELES DE AGAROSA.....	96
ANEXO 4. PREPARACIÓN Y REVELADO DE GELES DE POLIACRILAMIDA.....	97
ANEXO 5. RELACIÓN FILOGENÉTICA A NIVEL DE SUBFAMILIAS DE <i>Ceroxylon</i> CON RESPECTO A LOS OTROS GÉNEROS PROBADOS.....	101

1. RESUMEN

Los bosques de las estribaciones noroccidentales andinas del Ecuador están amenazados por las actividades humanas, alterando de esta manera la ecología y consecuentemente la estructura genética y dinámica poblacional de muchas especies. El estado y la conservación de un ecosistema depende de la condición poblacional de las especies claves (especies que tienen múltiples interacciones ecológicas). *Ceroxylon echinulatum* (palma de ramos o palma de cera) es un componente importante dentro de los bosques andinos (>1000 metros sobre el nivel del mar). *C. echinulatum* es una palma dioica, de dosel, de lento crecimiento, que forma poblaciones oligárquicas dentro del paisaje andino en nichos altitudinales específicos. Mediante análisis moleculares se estudio las alteraciones que genera el impacto humano sobre la estructura genética de *C. echinulatum*. Con el objeto de tener una apreciación clara del estado del ecosistema, se escogió dos áreas de estudio claves, (a) Nanegalito siendo el ejemplo de un bosque alterado y (b) Mindo siendo ejemplo de un bosque no alterado. Dentro de cada localidad se hizo el muestreo de plántulas y de adultos, de esta manera comparar dos generaciones (comparación temporal) y además dos localidades (comparación espacial). Para determinar la condición de la estructura genética de esta especie, mediante la utilización de siete microsatélites nucleares polimórficos, se analizaron la diversidad genética, Estadísticos – F (F_{is} y F_{st}) y distancia genética. Los resultados mostraron que para los parámetros de diversidad genética no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguna de las subpoblaciones ni entre poblaciones. Las plántulas de Nanegalito mostraron un alto nivel de endogamia y estadísticamente se la determinó como una subpoblación bajo depresión endogámica, lo que refleja el grado de impacto humano a la cual ha estado sometido el bosque de Nanegalito en las últimas décadas. La distancia genética y el índice de fijación (F_{st})

muestran que ninguna de las subpoblaciones es significativamente diferenciada entre ellas, demostrando que a pesar de los diferentes niveles de impacto humano todavía existe flujo génico entre las subpoblaciones. Este trabajo demuestra que el bosque de Mindo es prioritario en la conservación de los bosques andinos del occidente de Pichincha y plantea un proceso a seguir para incluir más estadios generacionales y nuevas poblaciones con el objeto de obtener más sustento en los datos de dinámica genética poblacional siendo la base a futuro de un modelo de conservación efectivo.

Palabras clave: *Ceroxylon echinulatum*, diversidad genética, microsatélite, Estadísticos – F , endogamia, distancia genética, depresión endogámica.

2. ABSTRACT

Human activities are a threat for Ecuadorian Andean northwest forests. These activities modify the ecology of many species, and consequently their own genetic structure and population dynamics. The condition of the “key species” populations reflect the status and conservation of any ecosystem; knowing as “key species” as those that interact between each other in many ecologically ways. One key species was analyzed in this investigation: *Ceroxylon echinulatum* (wax palm) is an important component into the Andean forests (>1000 meters above the sea level). *C. echinulatum* is a dioecious, canopy, slow growing palm. It forms oligarchic populations in specific altitudinal niches of the Andean landscape. Through molecular analysis it had been recognized the genetic alterations occurred as consequence of human impact in *C. echinulatum*. This recognition allows to appreciate the general ecosystem status. In order to have a clear appreciation of this ecosystem status, I chose two study areas (a) Nanegalito as a modified forest example and (b) Mindo as a mature forest example. Seedlings and adults of this species were sampled into each location to make a comparison between two generations (temporal comparison) and also between two locations (spatial comparison). The condition of the genetic structure of this species has been determined through genetic diversity, $F -$ Statistics and genetic distance analysis. For achieving these we used of seven polymorphic nuclear microsatellites. My results have not shown statistically significant differences among the four subpopulations or populations considering any of genetic diversity parameters. Seedlings of Nanegalito area shows a high level of inbreeding and it was determined statistically as a subpopulation under inbreeding depression, this reflect decades of high level of human impact in Nanegalito’s forest. The genetic distance and the fixation index

(F_{st}) shows that none of the subpopulations are statistically differentiated among them showing that genetic flux still remains between subpopulations in spite of the different levels of human impact into locations and generations. This investigation demonstrates Mindo's forest priority for Andean forests conservation in the northwest of Pichincha. Additionally set out a process which could include more generational stages and new populations (locations) in order to obtain stronger data of population genetic dynamics and therefore more effective conservation model in future.

Key words: *Ceroxylon echinulatum*, genetic diversity, microsatellite, F – Statistics, inbreeding, genetic distance, inbreeding depression.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. PRINCIPALES ACTIVIDADES HUMANAS Y SUS EFECTOS SOBRE LOS HÁBITATS EN EL NOROCCIDENTE DEL ECUADOR.

Los hábitats naturales del noroccidente del Ecuador, desde los páramos hasta los bosques tropicales en la línea costera, han sido gradualmente degradados durante las últimas décadas (Rhoades, 2001). Desde los primeros asentamientos indígenas hasta la actualidad, esta zona en particular ha sido escogida por su gran cantidad de recursos naturales, suelos fértiles y su amplia gama de condiciones climáticas (Acosta-Solís, 1966; Cañadas-Cruz, 1983; Salomon, 1946a). Esta explotación y aprovechamiento histórico de los recursos en el noroccidente del Ecuador comprende principalmente: extracción de madera, aprovechamiento de agua dulce, la utilización de diversas especies de plantas y la caza de animales silvestres para consumo alimenticio (Acosta-Solís, 1961).

Los suelos fértiles que se encuentran en esta región favorecen a la agricultura, tanto de especies nativas como de especies introducidas (Acosta-Solís, 1961; Acosta-Solís, 1962), lo que a su vez impulsa la deforestación y empobrecimiento del suelo debido a la expansión de la frontera agrícola y la práctica de monocultivos de gran extensión. Esto también atrae a varias plagas y por tal razón se promueve a la utilización de pesticidas que no solo afectan a las plagas dentro del cultivo sino que también afectan a toda la cadena trófica de los remanentes de bosques circundantes (Buschbacher, 1986; Costa y Magnusson, 2002; Rhoades, 2001).

Adicionalmente la ganadería, ha contribuido a la transformación del hábitat ya que grandes extensiones de bosque fueron convertidas a pastizal para la alimentación del ganado (Rhoades, 2007). En el caso particular del ganado bovino se ha calculado que una vaca estándar de unos 500 kg de peso consume diariamente alrededor de 77 kg de pasto, lo que en otras palabras significa que una vaca consume aproximadamente 100 m² de pasto al día (Bargo, 2008). Siendo el ganado bovino el de mayor práctica en el noroccidente ecuatoriano se explica la gran extensión de bosques transformados a pastizal que se necesita para que un grupo de estos animales se alimente anualmente. También es conocido que el maltrato al suelo dado por las pezuñas del ganado bovino tienen un efecto negativo, ya que dañan a las semillas y dejan expuesto los nutrientes del suelo por la remoción constante de la tierra permitiendo que estos se erosionen con las lluvias (Biggs *et al.*, 2004; Sadeghian *et al.*, 2009). Sumado a estos factores de amenaza, se debe recalcar que el pasto que es usado para el pastoreo es una especie vegetal introducida, siendo esta una especie invasiva que ofrece una gran resistencia para ser erradicado y que a su vez es un competidor fuerte a comparación de las especies nativas (Rhoades, 2001).

El impacto humano (explotación de recursos, expansión de la frontera agrícola, alteración del paisaje, introducción de especies foráneas, entre otros) ha dado lugar a repercusiones ecológicas negativas en el noroccidente ecuatoriano y por lo tanto en el noroccidente de Pichincha; efectos, los cuales han sido pobremente estudiados para esta zona. De esta manera, para emprender programas de conservación de la biodiversidad es imprescindible realizar estudios ecológicos y poblacionales de los especies claves (componentes importantes) del bosque estudiado. Las especies claves son denominadas así porque poseen múltiples interacciones ecológicas, siendo particularmente importantes para el funcionamiento del

ecosistema y, en este caso, la recuperación del bosque. Estos estudios permitirían tratar los problemas de una manera direccionada y directa a favor del bosque y su biodiversidad (Bawa y Seidler, 1998).

3.2. RESEÑA HISTÓRICA DEL EFECTO ANTROPOGÉNICO EN LOS BOSQUES DE LAS ESTRIBACIONES ANDINAS DEL OCCIDENTE DE PICHINCHA.

El bosque nublado o subtropical en el occidente de Pichincha (situado entre los 1000 a 2500 metros sobre el nivel del mar), ha sido lugar de asentamientos humanos desde hace cientos de años atrás (Cañadas-Cruz, 1983; Salomon, 1946b; Sierra, 1999). El occidente de Pichincha ha tenido una importante historia de colonización, empezando desde el año 600 d.C. reconociendo a los Yumbos como la primera cultura asentada en esta zona, y desde esos primeros asentamientos hasta la actualidad las poblaciones humanas han ido cambiando e incrementándose; y consecuentemente el paisaje también se ha ido alterando con el pasar de los años (Jara, 2006; Rhoades, 2001).

Se estima que los Yumbos estuvieron asentados en las estribaciones noroccidentales de Pichincha entre los 600 d.C. hasta los 1660 d.C. y durante este periodo fue una cultura importante para el comercio indígena (Jara, 2006). Este grupo étnico se convirtió en un nexo importante entre los indígenas de la costa y los indígenas asentados principalmente en Quito siendo a su vez una gran potencia exportadora para la época (Rhoades, 2001). Los Yumbos vivían organizados en pequeños caseríos y tenían un modo de gobierno descentralizado dirigido por “shamanes” locales por cada caserío (Rhoades, 2001). Los caseríos se dedicaban al intercambio de productos entre la costa y la sierra, a razón de esto se construyó una red de

caminos (coluncos) que cubría toda la zona conectando los caseríos y las vías principales acceso a Quito y a la costa (Jara, 2006; Salomon, 1946a). Pero también tenían como actividad el cultivo de pequeñas parcelas con los productos principales de la zona (algodón, ají, palmito, hierbas medicinales) y la obtención de otros productos para la exportación como pescado seco, sal, oro, miel y animales silvestres (Jara, 2006; Rhoades, 2001). El impacto humano sobre los bosques durante este periodo se podría deducir que fue bajo, ya que la agricultura era limitada y las parcelas de cultivo se rotaban periódicamente, y por las otras actividades al haber existido una densidad poblacional pequeña (3000 habitantes para el final de la época de los Yumbos, siglo XVI) el impacto era limitado dentro de la gran extensión de bosque que debía existir en esos tiempos (Rhoades, 2001).

Para después del siglo XVI habían llegado los primeros colonos y misioneros españoles con el objeto de explotar nuevos productos y catequizar a los “indígenas libres” como se les denominaba a los Yumbos. La dominación sobre los Yumbos fue infructuosa debido al gobierno descentralizado de los Yumbos y muchos caseríos lograron sobrevivir durante mucho tiempo con sus tradiciones y cultura, pero por la presión impuesta por el régimen colonial, los shamanes ordenaron ataques entre caseríos dando lugar a una “autodestrucción cultural” y por lo tanto la desaparición de los Yumbos como grupo étnico en la zona (Rhoades, 2001). Por otro lado, los colonos empezaron a cultivar los productos de la zona en extensiones grandes y fijas de terreno, pero además se hizo la inclusión de nuevos productos para el cultivo como, caña de azúcar, cacao, banano, aguacate, piña, berenjena, cidro, limón, naranja, naranjilla, guabas, chontaduro, maíz, yuca, camote, entre otros (Jara, 2006; Rhoades, 2001; Salomon, 1946b); con los colonos también se inició la explotación maderera, específicamente del cedro (Rhoades, 2001). Después del siglo XVI la caña de azúcar fue el producto más

importante de la zona, utilizada tanto la producción de agua ardiente como para la elaboración de azúcar siendo las extensiones más grandes de cultivo para esa época (Rhoades, 2001). Se entiende que la agricultura aumentó considerablemente después de los Yumbos en esta zona y las vías de comunicación fueron mucho más transitadas, por lo tanto el paisaje del bosque también sufrió transformaciones, sea para crear nuevas rutas de comercio o comunicación, o para crear nuevas aéreas de cultivo y ganadería (Rhoades, 2001).

A inicios del siglo XX hasta la actualidad los efectos antropogénicos cambiaron en la zona de gran manera; debido al aumento de colonos, a la creación de nuevos caminos, a la promoción de la agricultura por parte del gobierno (reforma agraria) y a la inclusión de la ganadería en la zona (Rhoades, 2001). Estas actividades junto a la agricultura a gran escala, alteraron durante muchos años el ecosistema del bosque nublado andino en el occidente de Pichincha, alterando de igual manera las interacciones ecológicas entre las especies que se desenvolvían en la zona (Freeland, 2005). Este último siglo fue el de mayor explotación en la zona y, por lo tanto, el de mayor degradación del hábitat existente llevando a estos bosques a una condición crítica (Rhoades, 2001). Actualmente grandes extensiones del occidente de Pichincha está constituido por un mosaico de remanentes de bosques y pastizales.

3.3. LAS PALMAS ANDINAS Y SU IMPORTANCIA.

Las palmas son un componente ecológico importante en los bosques tropicales sea por su diversidad, abundancia o interacciones ecológicas (Borchsenius *et al.*, 1998). La familia Arecaceae tiene una distribución pantropical y consiste de alrededor de 200 géneros y de 2522 especies (Borchsenius *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 2008). Cerca de la mitad de las especies

se encuentran en la región tropical del sudeste asiático (Melanesia) siendo la región más diversa para esta familia; seguida por el continente americano con 67 géneros y 730 especies y luego por Madagascar e islas del océano Índico con 193 especies (Borchsenius *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 2008). En Ecuador se encuentran 31 géneros y 129 especies de palmas, lo cual representa el 46% y 20% respectivamente de la diversidad presente en el continente americano (Borchsenius *et al.*, 1998). La región andina del Ecuador (>1.000 metros sobre el nivel del mar) con un área aproximada de 70.000 Km², alberga alrededor 15 géneros y 50 especies de palmas siendo la región con más endemismo dentro del país para este grupo vegetal (Borchsenius *et al.*, 1998). Las diferentes especies de palmas en la región andina caracterizan, por su diversidad y abundancia, regiones ecológicas y altitudinales a lo largo de las estribaciones andinas. Especies como *Geonoma undata*, *Ceroxylon ventricosum*, *Ceroxylon echinulatum*, *Prestoea acuminata*, *Dictyocaryum lamarckianum*, entre otras especies, forman poblaciones densas en los boques andinos, llegando a constituir elementos florísticos importantes para el equilibrio del bosque (Borchsenius *et al.*, 1998).

Las palmas tienen múltiples interacciones ecológicas dentro de los bosques andinos. La familia Arecaceae es uno de los grupos vegetales con una gran capacidad de fijación de carbono, ya que crean abundante materia orgánica en cortos periodos de tiempo reflejado en la formación de estructuras vegetativas y reproductivas de gran tamaño (Leblanc *et al.*, 2006). Durante periodos de senescencia las estructuras morfológicas de las palmas caen al suelo y se descomponen aportando así con nutrientes a los suelos donde crecen (Bernal, 2007; Borchsenius *et al.*, 1998; Leblanc *et al.*, 2006). Así también las palmas interactúan con otros organismos de manera directa: 1) prestan refugio a varias especies de animales, 2) atraen una gran diversidad de polinizadores, principalmente coleópteros, 3) proveen de alimentos y

nutrientes a gran cantidad de insectos y microorganismos descomponedores por la acumulación de materia orgánica y 4) son importantes productoras de frutos que son aprovechados por mamíferos y aves, los cuales a su vez favorecen a la dispersión de semillas (Borchsenius *et al.*, 1998; Gaitán, 2003).

3.4. *Ceroxylon echinulatum* COMO OBJETO DE ESTUDIO Y COMO UN COMPONENTE IMPORTANTE DEL PAISAJE ANDINO.

Ceroxylon es el único género que tiene una distribución estrictamente andina, ocupando un rango de distribución altitudinal entre los 900 a 3000 metros sobre el nivel del mar. Las especies dentro de este género están distribuidas a lo largo de las estribaciones andinas desde Venezuela, bajando hacia el sur por Colombia, Ecuador, Perú, hasta llegar a Bolivia (Borchsenius *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 2008). Se han descrito doce especies dentro del género *Ceroxylon* distribuidas en los andes, de las cuales seis se encuentran en el Ecuador, siendo estas: *C. amazonicum*, *C. echinulatum*, *C. parvifrons*, *C. parvum*, *C. ventricosum* y *C. vogelianum*.

Ceroxylon echinulatum Galeano, conocida en el Ecuador como la palma de la cera o palma de ramos; es una palma dioica, que posee un tallo solitario que a menudo sobrepasa los 20 metros de altura, con un diámetro promedio de 15 a 30 centímetros. El tallo es de color blanco debido a que se encuentra cubierto por una capa de cera blanca y además presenta cicatrices foliares que forman anillos de color oscuro (marrón o negro) alrededor del tronco (Borchsenius *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 2008). Las cicatrices muestran las inserciones antiguas de las hojas lo que permite obtener un estimado de la edad basándose en la tasa de crecimiento foliar (Bernal,

2007). Las hojas miden *c.a.* 5 metros y tienen aproximadamente 100 pinnas por lado, son péndulas, de color verde en el lado adaxial y de color blanco en el lado abaxial debido al recubrimiento de una delgada capa de cera. Las pinnas centrales miden de 70 a 90 centímetros de largo y de 3 a 4 centímetros de ancho. Las inflorescencias son intrafoliares, péndulas y miden *c.a.* 3 metros de largo. Los frutos son globosos de 1 a 2 centímetros de diámetro, de color anaranjado o rojo al madurar (Borchsenius *et al.*, 1998; Dransfield *et al.*, 2008).

C. echinulatum es un componente funcional importante dentro paisaje andino debido a su densidad local, las múltiples interacciones con polinizadores, dispersores y predadores, además de ser un importante productor de materia orgánica que alimenta los suelos de las estribaciones del ecosistema andino (Borchsenius *et al.*, 1998). Esta especie forma poblaciones oligárquicas dentro de un rango altitudinal específico, entre los 1200 a 2200 metros sobre el nivel del mar, distribuyéndose notoriamente a lo largo de las estribaciones occidentales y orientales de los Andes Ecuatorianos (Borchsenius *et al.*, 1998).

Ceroxylon echinulatum (en las estribaciones occidentales andinas) fue conocida anteriormente como *Ceroxylon alpinum* subsp. *ecuadorensis*. Estudios recientes, basados en datos morfológicos (Galeano, com.per) y moleculares (Trénel, 2007), proponen un modelo taxonómico que sugiere la inclusión del taxón *Ceroxylon alpinum* subsp. *ecuadorensis* dentro de *Ceroxylon echinulatum*. La publicación científica que oficialice la sinonimia entre estos dos taxa y consecuentemente regularice el uso de *C. echinulatum* como el nombre científico adecuado para esta especie será dada a conocer en el año en curso. Para la presente investigación se adoptará el nombre de *Ceroxylon echinulatum* para el grupo de palmas estudiado.

3.5. MICROSATÉLITES (SSR's) COMO MARCADOR MOLECULAR

Los marcadores moleculares son herramientas que permiten obtener datos a partir de la información genética de un organismo y pueden ser clasificados en dos grandes grupos, marcadores codominantes y marcadores dominantes (Freeland, 2005; Watson *et al.*, 2007).

Los marcadores codominantes permiten identificar los alelos que están presentes en un locus particular y la condición de cada individuo (homocigosis o heterocigosis); entre estos marcadores se encuentran los RFLP's (Restriction Fragment Length Polymorphisms), aloenzimas (isoenzimas) y microsatélites (SSR's; Simple Sequence Repeats) (Watson *et al.*, 2007). Por otro lado, los marcadores dominantes permiten solamente identificar al alelo dominante dentro de un locus, es decir que no permite evidenciar la condición (homocigosis o heterocigosis) dentro de cada individuo; como marcadores dominantes se encuentran principalmente a los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) y a los AFLP's (Amplified Fragment Length Polymorphisms) (Watson *et al.*, 2007).

Los microsatélites (SSR's) son secuencias cortas que pueden variar de 90 a 300bp constituidas por secuencias en tándem (Watson *et al.*, 2007). Estas secuencias pueden encontrarse tanto en genomas de organelas (cloroplastos, mitocondrias) como en el núcleo, por esta razón con este marcador se puede obtener datos uniparentales como biparentales (Freeland, 2005). Los microsatélites se caracterizan por: (1) ser marcadores codominantes altamente específicos, (2) secuencias no codificantes o neutras (no existe una selección evolutiva sobre estos) y (3) son locus altamente polimórficos y multialélicos (Beebe y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004; Watson *et al.*, 2007). La desventaja de estos marcadores es que la identificación de secuencias repetitivas dentro del genoma es un proceso largo y complicado de estandarizar

(Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). El grado de discriminación de este marcador es muy específico cuando la información proviene del núcleo lo que permite diferenciar variaciones entre individuos de un mismo taxón (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Los microsatélites, en la actualidad, son los marcadores más utilizados para análisis poblacionales a nivel molecular puesto que la información que pueden dar es confiable y efectiva ya que los alelos se distribuyen al azar y no existe selección sobre estos (es decir que son expresivamente neutros y por tal razón se puede aplicar un modelo mutacional neutro y al azar) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Las características de los microsatélites y la aplicación de este marcador ha favorecido el desarrollo de varios estudios en ecología, biogeografía, filogeografía, evolución y taxonomía (Beebee y Rowe, 2008). En plantas, estos marcadores permiten encontrar relaciones entre grupos de individuos o relaciones de flujo génico, fijación de alelos y endogamia, con estimaciones más precisas que otros marcadores (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Se puede encontrar varios ejemplos de estudios de ecología a nivel molecular enfocados a la conservación en especies de palmas, así como en, *Bactris gasipaes* (Cole, 2004; Couvreur *et al.*, 2006; Couvreur *et al.*, 2007), *Euterpe edulis* (Gaiotto *et al.*, 2003), *Phoenix atlantica* (Henderson *et al.*, 2006), *Cocos nucifera* (Perera *et al.*, 2000), *Phoenix dactylifera* (Zehdi *et al.*, 2004) y *Levistona carinensis* (Shapcott *et al.*, 2009), entre otros. Estos estudios abarcan una amplia variedad de análisis sobre los resultados obtenidos a partir de microsatélites, como estimación de diversidad y distancia genética, relación poblacional, análisis de paternidad, flujo génico y endogamia e índices de fijación (diferenciación entre grupos o poblaciones).

3.6. LA PROBLEMÁTICA DE *Ceroxylon echinulatum* Y SUS IMPLICACIONES ECOLÓGICAS.

Las poblaciones de *Ceroxylon echinulatum*, actualmente se encuentran amenazadas por la actividad humana. Durante las últimas décadas los bosques andinos han sido expuestos a la tala selectiva, degradación del hábitat, fragmentación y expansión de la frontera agrícola (Buschbacher, 1986; Costa y Magnusson, 2002; Rhoades, 2001; Shelton, 1985). Adicionalmente a estas amenazas, las poblaciones de *C. echinulatum* son afectadas por el extractivismo de sus hojas para la fabricación de artesanías durante las festividades de Semana Santa. Los campesinos que viven cerca del hábitat donde crecen las poblaciones de *C. echinulatum* extraen las hojas de individuos jóvenes (<10 metros), y adultos (>10 metros), con el objeto de obtener sus cogollos (hojas jóvenes no abiertas) para la fabricación de artesanías (Borchsenius *et al.*, 1998; Rhoades, 2001).

El impacto humano sobre los Andes tropicales genera la degradación del hábitat y la fragmentación de los bosques, entre otros problemas; amenazando de esta manera la diversidad biológica de estas zonas (Bawa y Seidler, 1998; Rhoades, 2001). Este impacto afecta de varias formas la estructura genética de las especies de plantas dentro de un ecosistema, 1) generando cambios en los niveles de endogamia y 2) alterando la estructura genética de tal manera que provoca variaciones en cada población y consecuentemente la diferenciación de estas entre sí (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). La estructura genética se define como el conjunto de variaciones genéticas presentes en una población lo cual puede ser determinado mediante marcadores moleculares como son los microsatélites (Freeland, 2005). De esta manera, la estructura genética de las poblaciones

naturales de plantas depende de las interacciones ecológicas entre polinizadores y dispersores, así como de la continuidad y calidad del hábitat (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005). La degradación y aislamiento de las poblaciones de *C. echinulatum*, debido a la fragmentación y la degradación del hábitat, puede provocar desequilibrios poblacionales que favorezcan la erosión de su base genética (alteraciones negativas irreversibles en la estructura genética) y el incremento de los niveles de endogamia (reproducción entre individuos emparentados), provocando de esta manera la reducción de la plasticidad adaptativa de la población para enfrentar nuevas condiciones ecológicas y además se puede ocasionar la expresión de genes deletéreos dando lugar a individuos no viables reduciendo aún más el número de individuos de la población (Bawa y Seidler, 1998; Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005). Estos efectos son aún más críticos en *C. echinulatum* debido a que es una especie de lento crecimiento, reportando que pueden pasar más de 80 años para que un individuo pueda llegar a ser sexualmente maduro (Bernal, 2007), y esta condición hace que sea más susceptible a las alteraciones aceleradas del impacto humano (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Las actividades humanas mencionadas previamente han provocado una presión negativa sobre las poblaciones de *C. echinulatum*, la cual afecta de diversas maneras la dinámica y estructura poblacional de la especie, alterando de esta manera las interacciones ecológicas dentro del hábitat donde se encuentran, lo cual a su vez se vuelve un problema importante al tratarse de esta especie por ser un componente importante dentro del ecosistema pues altera directamente la ecología de la zona (Bawa y Seidler, 1998; Buschbacher, 1986; Costa y Magnusson, 2002; Freeland, 2005; Shelton, 1985). Por esta razón es necesario generar información de base sobre esta especie en particular ya que podría influenciar a la estructura y dinámica del ecosistema directamente. Esta información permite evidenciar la condición de las poblaciones de *C.*

echinulatum, para de esta manera emprender un manejo eficaz y direccionado para la recuperación de esta especie, de otras especies amenazadas y del ecosistema en general.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Identificar los efectos del impacto humano en la estructura genética de *Ceroxylon echinulatum* en dos poblaciones del occidente de Pichincha.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

La diversidad genética de una población vegetal en un bosque no alterado tiende a ser mayor que en una población vegetal en un bosque alterado; en donde las condiciones ecológicas y de flujo génico han sido modificadas (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). En base a este postulado, se espera que los parámetros de diversidad en una población silvestre sean mayores que los obtenidos de una población proveniente de un bosque alterado. Por lo tanto, mediante los datos obtenidos a partir de microsátélites se determinará si existe una mayor diversidad (mayor variabilidad) en una población que no ha sido alterada en contraste a una que si lo ha sido.

Ceroxylon echinulatum posee una tasa de lento de crecimiento. Bernal (2007) reporta que se requiere más de 80 años para que un individuo de *Ceroxylon quindiuense* llegue a ser sexualmente maduro. Esto sugiere que los individuos adultos y las plántulas podrían reflejar historias ecológicas diferentes. En una población donde el bosque ha sido alterado gradualmente al pasar de los años, los individuos adultos representan las condiciones ecológicas cuando el bosque no fue mayormente afectado por el efecto antropogénico y por lo

tanto las interacciones ecológicas han sido poco alteradas; mientras que, las plántulas representan un estado reciente de flujo génico que refleja la calidad del hábitat actual y las condiciones ecológicas existentes donde existe fragmentación, degradación, extractivismo, tala selectiva, entre otros disturbios. Bajo estos dos supuestos, se espera que en un bosque alterado exista una alteración de la estructura genética en las plántulas frente a los adultos, y por otro lado, en un bosque que no ha sido alterado se esperaría una constante en la estructura genética para ambas condiciones (plántulas y adultos). Consecuentemente, en la presente investigación, por medio la información molecular obtenida, se comprobará si el impacto humano gradual ha tenido un efecto directo sobre la estructura genética de la población en cuestión.

Para generar información genética de un organismo sin antecedentes de estudios moleculares, es necesario la modificación y aplicación de métodos utilizados en estudios desarrollados para otros organismos ajenos al estudiado. Por tal razón, en la presente investigación además, de responder a las hipótesis planteadas, se establecerá la estandarización de protocolos tanto para extracción de material genético a partir de tejidos no comunes, como para la transferencia y utilización de marcadores moleculares (microsatélites) descritos para otras especies.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. ÁREA DE ESTUDIO.

Con el objeto de comparar la estructura genética de las poblaciones de *C. echinulatum* bajo diferentes grados de impacto humano dentro de una visión histórica y espacial, se escogió dos áreas de estudio al occidente de Pichincha; una determinada como un bosque no alterado y la otra como un bosque alterado. Dentro de cada área se escogieron los dos estadios generacionales más distantes del ciclo de vida de la palma (plántulas y adultos). Se define a un bosque no alterado como aquel que está compuesto por árboles altos (>20 metros de altura) y de anchos de diámetro (>30 centímetros de diámetro a la altura del pecho) y cobertura vegetal continua. Un bosque alterado es reconocido como aquel que tiene discontinuidad del dosel, pastizales extensos, un paisaje heterogéneo, ausencia de árboles de gran fuste y en donde existe referencia histórica de actividad humana.

El bosque de la comunidad de Miraflores (Nanegalito, situada geográficamente en las coordenadas N 0°4'0"; O 78°40'0") (figura 1); fue seleccionado como un bosque alterado. En las últimas décadas los colonos han favorecido la expansión de la frontera agrícola y en la mayoría de zonas han cambiado el paisaje de bosque a pastizal para dar lugar a la actividad ganadera, creando de esta manera un mosaico de remanentes de bosque y pastizales (Rhoades, 2001). Esta área ha sido tradicionalmente sometida a tala selectiva (cedro principalmente), actividad que afecta la estructura del bosque, creando una degradación y discontinuidad en este. Adicionalmente, en esta zona las poblaciones de *C. echinulatum* han sido afectadas por el

extractivismo de sus hojas para la fabricación de artesanías que son usadas en las festividades de Semana Santa (Borchsenius *et al.*, 1998; Rhoades, 2001).

El bosque protector Mindo fue seleccionado como modelo de bosque no alterado, específicamente el sector de la reserva privada “Río Bravo” (situado geográficamente en las coordenadas S 0°03’04,29”; O 78°46’41,89”) (figura 1). El bosque protector Mindo cubre parte de las estribaciones occidentales del volcán Pichincha (192 km² de extensión). En este bosque no se observa un impacto o intervención humana evidente. El bosque de Mindo tiene un dosel alto (>20 m) y continuo, con presencia de árboles de gran diámetro (>30 cm) y ausencia de parches o fragmentación producto de actividad humana. La continuidad del bosque es constante expandiéndose entre montañas, quebradas y ríos (Ministerio de Ambiente, 2009).

Tanto la zona escogida de Nanegalito como la de Mindo, corresponden a la región bioclimática del bosque nublado (Cañadas-Cruz, 1983), los cuales se sitúan en un rango altitudinal de 1500 – 2500 metros sobre el nivel del mar, esta zona tiene una precipitación promedio anual de 1579,9 mm y una temperatura promedio anual de aproximadamente 16°C (Cañadas-Cruz, 1983; Ministerio de Ambiente, 2009; Sierra, 1999), pero cada punto en particular de esta región presenta variaciones en estas constantes del bioclima dependiendo de la altitud, orientación y ángulo de inclinación del terreno (Cañadas-Cruz, 1983; Sierra, 1999). Las diferencias entre estas localidades (Nanegalito y Mindo) se encuentran tanto en especies vegetales como en estructura del hábitat (Acosta-Solís, 1966), pero la diferencia fundamental que se observa entre las dos localidades en cuanto a las poblaciones de *Ceroxylon echinulatum* como componentes importantes del bosque, es que en el bosque alterado (Nanegalito) se

observa una mayor densidad de individuos que en el bosque no alterado (Mindo) y en todos los estadios (adultos, juveniles y plántulas); mientras que, en el bosque no alterado (Mindo) los individuos adultos se encuentran distanciados entre si, y la densidad de individuos juveniles y plántulas es menor.

5.2. COLECCIÓN DE MUESTRAS.

En cada localidad escogida para este estudio (Nanegalito y Mindo), se tomaron muestras de plántulas ($n > 30$) y adultos ($n > 30$) (tabla1). Con el fin de organizar los grupos para ser analizados, al conjunto de muestras en general de Nanegalito ($n > 60$) así como a las de Mindo ($n > 60$), se las estableció como poblaciones; mientras que, a las plántulas ($n > 30$) y adultos ($n > 30$) de cada población se las estableció como subpoblaciones.

En cuanto al muestreo de individuos adultos, al ser una especie dioica, se tomó muestras proporcionalmente similares de hembras y machos. Las muestras fueron tomadas a lo largo de un transecto en línea recta dentro de cada tipo de bosque, tomando un individuo al azar cada 100 metros aproximadamente para cada estadio (plántulas y adultos). Para el muestreo de plántulas se procedió a tomar directamente el cotiledón de las semillas recién germinadas para luego secarlas con sílica gel y extraer el ADN. En los individuos adultos se optó por realizar el muestreo a partir del tejido apical de las raíces adventicias jóvenes para la extracción de ADN, las cuales fueron guardadas en una solución de alcohol al 90% después de su obtención en el campo, esta alternativa se tomó debido a que el muestreo a partir de las hojas jóvenes era inaccesible debido a la altura de los individuos adultos ($> 20m$).

5.3. EXTRACCIÓN DE ADN.

Las muestras colectadas en el campo (Anexo 1a y 1b) fueron tratadas según el caso: plántulas (tejido foliar) y adultos (tejido meristemático), para la extracción de ADN mediante el kit comercial de Invitrogen específico para extracción a partir de tejidos vegetales (Anexo 2).

Para las plántulas (tejido foliar), el cotiledón seco fue pulverizado para luego ser maceradas en un mortero junto al buffer de resuspensión provisto por el kit. Una vez homogeneizada la solución se procedió con el protocolo de extracción de Invitrogen. Las raíces obtenidas (tejido meristemático) fueron cortadas separando la región meristemática (punta de la raíz, conocida comúnmente como zona de crecimiento) y se seccionó en fracciones delgadas y pequeñas, para luego ser maceradas en el mortero y continuar con los pasos descritos en el protocolo de extracción.

Una vez obtenidas las soluciones de ADN de cada muestra, fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio para evidenciar, mediante luz UV, la concentración y calidad de ADN en la solución. La concentración de ADN fue determinada por la intensidad de la fluorescencia de la muestra al compararla con una escalera de concentraciones (Low DNA Mass Ladder de Invitrogen), mientras que la calidad de ADN de la muestra fue hecha de manera visual distinguiendo si había o no degradación o contaminación (proteínas, sales o ARN).

5.4. PRUEBAS PCR Y ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS DE AMPLIFICACIÓN.

Con el ADN obtenido de las muestras se hizo varias pruebas para evaluar su viabilidad para ser manipulado (cantidad y calidad del ADN). Para las pruebas PCR se utilizó los primers de microsatélites escogidos previamente según la bibliografía. Se realizó la transferencia de secuencias primers descritas para géneros de subfamilias distintas a *Ceroxylon* como *Bactris* (Billotte *et al.*, 2004a), *Oenocarpus* (Montúfar *et al.*, 2006) y *Phoenix* (Billotte *et al.*, 2004b).

Estas pruebas fueron realizadas en base a los protocolos (condiciones) de amplificación descritos por cada autor. Adicionalmente, se hizo pruebas con los microsatélites específicos para el género *Ceroxylon* descritos por Gaitán (2003), basadas de igual manera en el protocolo y condiciones descritas por la autora.

Una vez obtenidas las amplificaciones, estas fueron probadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Las muestras fueron observadas en los geles mediante la tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV, comprobando de esta manera la calidad y concentración del producto PCR. En este caso la calidad y concentración se la realizó de manera visual; para la calidad se observó si la amplificación no mostraba bandas inespecíficas y si la amplificación obtenida se encontraba en el tamaño de fragmento esperado, lo cual fue determinado mediante una escalera de tamaños para agarosa (100 bp DNA Ladder de Invitrogen), por otro lado, la concentración de la amplificado fue determinado cualitativamente basándose en la intensidad de fluorescencia del fragmento.

Para cada microsatélite que dio una señal positiva de amplificación, se procedió a estandarizar el protocolo manipulando las concentraciones de los componentes de la reacción PCR y las condiciones del programa de amplificación (tiempo y temperatura), con el objeto de mejorar calidad y concentración del producto PCR. Una vez estandarizado el protocolo para cada microsatélite se procedió a realizar la amplificación de todas las muestras de cada población (n=120).

5.5. PRUEBAS DE MICROSATELITES POLIMÓRFICOS Y OBTENCIÓN DE DATOS.

Para evidenciar los resultados de las amplificaciones y observar diferencias alélicas dentro de la población, se realizó la migración de las muestras (amplificaciones) en geles de poliacrilamida al 6% mediante electroforesis. El polímero de poliacrilamida tiene una alta resolución permitiendo observar claramente diferencias de hasta 2bp entre fragmentos. Las proporciones de reactivos así como el revelado de los geles de poliacrilamida al 6% se los hicieron según el protocolo descrito por el kit de secuenciamiento de Promega (Anexo 3).

Las muestras para ser corridas en el gel de poliacrilamida, fueron denaturadas física (a una temperatura de 94°C por 4min) y químicamente (agente químico denaturante, formamida al 98%). La solución de formamida fue puesta directamente en la solución de la muestra en proporción 1:1. Las muestras denaturadas fueron cargadas en un orden específico, un individuo amplificado por cada pocillo. Las condiciones de electroforesis del gel fueron de 1500V, 50mA y 100W por aproximadamente 2 horas (el tiempo varía según el tamaño del fragmento esperado).

Los microsatélites al ser marcadores codominantes, en especies diploides, permiten evidenciar los dos alelos (sean iguales o diferentes) presentes en un locus particular. Las amplificaciones de cada población se corrieron en los geles de poliacrilamida, haciendo un gel por microsatélite y población. Después de la migración y revelado del gel, se determinó si el microsatélite era polimórfico o monomórfico, lo cual fue establecido por la variación alélica que exhibían las amplificaciones.

5.6. TABULACIÓN Y ANÁLISIS DE DATOS

Los microsatélites que se identificaron como polimórficos para las poblaciones fueron leídos en el gel de poliacrilamida y se elaboraron matrices basadas en los tamaños moleculares de los alelos con las variantes dadas de cada microsatélites dentro de cada población. El tamaño de cada alelo fue determinado mediante la correlación de la posición del alelo con respecto a una escalera específica para poliacrilamida, la cual permite reconocer diferencias en intervalos de 10pb (30 – 330 bp AFLP DNA Ladder de Invitrogen).

Se crearon matrices basadas en los pesos moleculares de cada alelo (matrices alélicas) por cada microsatélite amplificado, y estas fueron transformados a diferentes formatos mediante el programa MSTools (Park, 2001) para ser utilizados con otros programas estadísticos. Las matrices creadas se ordenaron escogiendo 30 muestras para cada subpoblación.

Los datos y matrices fueron tabulados mediante el complemento del programa EXCEL denominado MSTools (Park, 2001), el cual reconoce los datos introducidos, los revisa por posibles errores (datos faltantes, excesiva diferencia entre alelos, entre otros) y crea análisis

básicos basándose en los datos reconocidos (frecuencias alélicas, proporciones de heterocigotos y muestras redundantes) y transforma la matriz de datos final a diferentes formatos para ser leídas por otros programas tales como FStat (Goudet, 2002), GenePop (Rousset, 2007) y Arlequin (Excoffier, 2007).

5.7. ANÁLISIS MOLECULARES.

El primer análisis que se realizó fue el desequilibrio ligado (linkage disequilibrium) para determinar si los loci (microsatélites) se encontraban o no ligados; es decir, si tenían o no una distribución al azar. Lo cual también fue corroborado con el cálculo de las frecuencias alélicas dentro de cada subpoblación. La frecuencia alélica es la proporción en la que se encuentra un alelo particular dentro de una población o grupo (Beebee y Rowe, 2008). El cálculo de las frecuencias alélicas es una herramienta que permite sustentar otros cálculos, así como también permite evidenciar la dinámica de la estructura genética dentro de un grupo o población y compararla con otra.

La estructura genética de una población se la puede determinar analizando sus variaciones bajo ciertos parámetros. Se realizaron los siguientes análisis para determinar la estructura genética y su variación dentro y entre las poblaciones: 1) diversidad genética, 2) estadísticos – F y 3) distancia y relación genética entre grupos.

Se escogieron como estimadores de diversidad genética al número de alelos (A_o), la riqueza alélica (diversidad alélica, R_s) y la diversidad génica (heterocigosidad esperada, H_e), siendo estos los principales estimadores de diversidad y dan como resultado datos concretos de la

condición y variación de la diversidad genética de los grupos o poblaciones a estudiar (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Para los análisis de estructura genética de las subpoblaciones y poblaciones, fueron escogidos dos estimadores que muestran las variaciones dentro de un grupo y entre grupos, siendo estos el coeficiente de endogamia (F_{is}) y el índice de fijación (F_{st}), respectivamente. Adicionalmente, para evidenciar la relación entre subpoblaciones y poblaciones se realizó el análisis de la distancia genética de Nei (Nei, 1972) y un AMOVA (Análisis Molecular de la Varianza) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004) con las principales variables entre las poblaciones y entre las subpoblaciones, tanto de diversidad como de estructura genética.

Para analizar los datos se optó por usar tres programas, los cuales fueron escogidos por los cálculos que ofrecían para el desarrollo de esta investigación. Los programas escogidos fueron: Arlequin (Excoffier, 2007), FStat (Goudet, 2002) y GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006). Una vez convertidas las matrices mediante MSTools (Park, 2001) para que sean reconocidas por los programas Arlequin (Excoffier, 2007) y FStat (Goudet, 2002), y creada la matriz de GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006); se procedió a correr los análisis estadísticos correspondientes para la investigación.

5.7.1 DESEQUILIBRIO LIGADO

El desequilibrio ligado (linkage disequilibrium) determina si los microsatélites o loci usados en un análisis molecular se distribuyen al azar o se encuentran ligados; es decir, si las

frecuencias de dos loci distintos varían conjuntamente, lo que en un análisis molecular puede presentar una lectura errónea debido a que los datos no cumplirían la condición estadística de independencia (Freeland, 2005). Estadísticamente el desequilibrio ligado es la probabilidad de que el resultado obtenido sea igual o menor al valor teórico en una tabla de valores (tablas de contingencia bajo el test de probabilidades exactas de Fisher) (Freeland, 2005).

5.7.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

Existen diversas formas para determinar la diversidad genética en una población, siendo estas, estimaciones basadas en diferentes parámetros relacionados con las frecuencias alélica y genotípicas de la población (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). De esta manera, una estimación simple de la diversidad genética es el número absoluto de alelos por locus (A_o), la cual se basa en el conteo directo de alelos por microsatélite en cada población o grupo (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Por otro lado, otro estimador de diversidad es la riqueza alélica (R_s), la cual está basada en el número promedio de alelos por locus (número esperado de alelos), lo cual nos puede dar números decimales dependiendo la proporción de cada alelo por locus y población, siendo calculados de la siguiente manera:

$$R_s = \sum_{i=1}^{n_u} 1 - \frac{\frac{2N - Ni}{2n}}{\frac{2N}{2n}}$$

donde $2n$ es el número esperados de alelos en un locus particular dentro de todos los loci que fueron muestreados ($2N$), N_i es número de alelos del tipo i dentro de los loci ($2N$) (Freeland, 2005). Es decir, que si en un grupo (una subpoblación, por ejemplo) tenemos 4 alelos en un locus determinado y 6 alelos en otro grupo (otra subpoblación) dentro del mismo locus diremos que en total hay 5 alelos en promedio para la población, $(4+6)/2=5$, en otras palabras es el número promedio de alelos dentro de la población (Freeland, 2005). El problema con este estimador es que es sensible al tamaño de muestra lo cual puede hacer que los resultados obtenidos tengan demasiada variación cuando se usa diferentes tamaños de muestra (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Otro cálculo que permite estimar la diversidad genética dentro de una población es la diversidad génica (Nei, 1973). Este parámetro es menos sensible al tamaño de muestra y al ser una estimación más directa sobre el genotipo reduce el error en el cálculo. La diversidad génica es calculada según la siguiente ecuación:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

donde x_i es la frecuencia del alelo i y m es el número de alelos que han sido encontrados en un locus determinado (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005). De esta manera, h (diversidad génica) representa la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar dentro de una población sean diferentes, es decir que h es equivalente, dentro del modelo Hardy – Weinberg, a los heterocigotos esperados (H_e) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Los estimadores antes mencionados de manera complementaria pueden ser una herramienta eficaz para determinar la condición de la diversidad genética dentro de una población. Lo que permite extrapolar la información obtenida para compararla con la obtenida para otras poblaciones y determinar las diferencias en la estructuración genética de cada población.

5.7.3. ESTADÍSTICOS – F

Un método comúnmente utilizado para cuantificar la diferenciación genética entre poblaciones son los denominados estadísticos – F (Wright, 1951). Estos se basan en la determinación de coeficientes de endogamia para describir el fraccionamiento de la variación genética dentro y entre poblaciones calculada a diferentes niveles (F_{is} , F_{st} y F_{it}) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005). Para este estudio se utilizarán dos de estos parámetros; (1) la endogamia dentro de un grupo o población (coeficiente de endogamia, F_{is}) y (2) la diferenciación entre grupos por fijación de alelos (índice de fijación, F_{st}).

El coeficiente de endogamia, en especies diploides, refleja la probabilidad de que un individuo en locus particular sea homocigoto; es decir, que bajo el supuesto del equilibrio de Hardy – Weinberg (EHW), existe un desbalance entre las proporciones esperadas entre heterocigotos y homocigotos dentro un grupo (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). El cálculo dentro de un grupo da un valor que varía entre -1 a +1, siendo 0 el equilibrio entre las proporciones entre heterocigotos y homocigotos (es decir, se encuentra en EHW). Cuando el valor del coeficiente de endogamia tiende hacia valores positivos se habla de endogamia (homocigosis mayor) y cuando supera el valor 0,25 (Wright, 1951) se dice que el grupo se encuentra bajo depresión endogámica (alta significación en el desbalance entre heterocigotos y

homocigotos, siendo la proporción de homocigotos mayor). En contraste, un valor negativo para el coeficiente representa que existe una mayor proporción de heterocigotos versus homocigotos (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Esta relación entre los genotipos se da por la siguiente ecuación:

$$F_{is} = (H_e - H_o)/H_e$$

donde H_o se refiere a los heterocigotos observados dentro del grupo estudiado y H_e se refiere a los heterocigotos esperados bajo el supuesto del EHW. En otras palabras, la ecuación determina la diferencia que existe en las proporciones entre H_e y H_o (Freeland, 2005).

Por otro lado, el índice de fijación (F_{st}) se basa en la proporción de homocigosis pero la probabilidad es obtenida entre pares de muestras entre grupos o poblaciones, obteniendo así diferencias entre cada grupo determinado por la probabilidad de fijación de alelos por cada locus analizado. De esta manera, las diferencias entre grupos son determinadas bajo la probabilidad que existe entre dos muestras cogidas al azar de grupos diferentes sean iguales para un locus, lo que permite evidenciar una relación genética entre grupos basada en la dinámica de la estructura genética. En otras palabras, si se obtiene que un mismo alelo de un locus específico se encuentra con igual probabilidad de fijación en dos grupos distintos, estos se encuentran más relacionados que otros grupos que difieren en esta probabilidad para este locus específico (Freeland, 2005). El índice de fijación es obtenido a partir de la siguiente relación:

$$F_{st} = (H_t - H_e)/H_t$$

donde He son los heterocigotos esperados dentro del grupo particular (subpoblación) a analizar mientras que Ht son los heterocigotos esperados de todos los grupos (población) (Freeland, 2005).

5.7.4. DISTANCIA Y RELACIÓN GENÉTICA ENTRE GRUPOS

Existen diversas formas para calcular la similaridad genética entre grupos y de esa manera estimar la distancia genética entre ellos. Para este propósito se usa comúnmente la distancia genética de Nei (1972) basada en la identidad genética lo cual permite ver la relación entre los grupos (Freeland, 2005). La identidad genética (I) es calculada de la siguiente manera:

$$I = \frac{\sum_{i=1}^m P_{ix}P_{ij}}{\sum_{i=1}^m P_{ix}^2 + \sum_{i=1}^m P_{iy}^2} \quad 0.5$$

donde P_{ix} es la frecuencia de un alelo i en la población x , P_{iy} es la frecuencia de una alelo i en una población y , y m es el número de alelos en un locus; el cálculo dará como resultado valores entre 1 y 0. Una vez llegado a ese resultado se lo reemplaza en la ecuación de la distancia genética de Nei (D):

$$D = -\ln I$$

lo cual dará como resultado un rango de valores de entre 0 a infinito. Cuando dos poblaciones comparten frecuencias alélicas similares, la similaridad genética (I) se va a aproximar a 1 y la

distancia genética (D) se aproximará a 0; mientras que, en el otro escenario, donde las dos poblaciones no tienen alelos en común, I tenderá a 0 y D tenderá al infinito (Freeland, 2005).

5.7.5. COMPARACIONES ENTRE POBLACIONES Y SUBPOBLACIONES.

Mediante el Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) se hizo la comparación entre las subpoblaciones (plántulas y adultos) y entre las poblaciones en general (Mindo y Nanegalito), de esta manera determinar las diferencias temporales y espaciales basadas en las principales variables de estructura genética. De esta manera: (1) Como variables de diversidad se compararon la riqueza alélica y diversidad génica, (2) como variables de diferenciación se comparó al F_{is} (entre individuos) y F_{st} (entre grupos), y (3) como variable de relación entre los grupos analizados se comparó a la distancia genética de Nei (Beebe y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

6. RESULTADOS

6.1. OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS.

Se muestreó un número similar de individuos ($n > 30$), tanto de plántulas como de adultos en cada tipo de bosque: no alterado (Mindó) y alterado (Nanegalito).

En cuanto a las plántulas era sencillo encontrar y reconocer individuos creciendo en el suelo del bosque; además se podía observar una gran cantidad de plántulas cerca de un individuo hembra adulto. Por estas razones y su fácil acceso, el muestreo de plántulas no presentó mayor problema. El tejido foliar de las plántulas fue secado mediante sílica gel y de esta manera fue procesado en el laboratorio.

El muestreo de individuos adultos presentó limitaciones físicas debido a la altura de los individuos ($> 20\text{m}$) y a la voluminosa corona envuelta en una gran vaina, lo cual dificultaba el acceso a muestras de hojas jóvenes. Por esta razón se optó por muestrear las raíces adventicias jóvenes de las palmas adultas. La raíz de los individuos adultos debía llegar fresca para su seccionamiento y prepararla para la extracción. Debido a que la raíz de *Ceroxylon echinulatum* es suculenta, se probaron dos alternativas para su obtención: (a) guardar la muestra en un sobre de papel, con el objetivo de absorber el exceso de agua y evitar la putrefacción del tejido; (b) guardar cada muestra en un tubo falcon (50 ml) con alcohol al 90%. Ambas alternativas dieron resultados positivos; se prefirió el muestreo con alcohol ya que se mantenía en mejores condiciones por mucho más tiempo.

6.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL ADN

La extracción por medio del kit comercial de Invitrogen fue satisfactoria para ambos tipos de muestras (cotiledones y raíces), obteniendo concentraciones totales de ADN adecuadas para la amplificación, lo cual fue probado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio. Las concentraciones de ADN obtenido variaban según la calidad de la muestra, encontrándose en un intervalo de 50 – 200ng/ul. En las muestras de raíz la concentración de ADN fue menor a lo obtenido a partir del cotiledón. Las muestras presentaron un leve grado de degradación, sin embargo esto no afectó a la amplificación de los microsatélites (loci) usados (figura 2).

6.3. BÚSQUEDA DE MICROSÁTELITES Y PRUEBAS PCR.

La transferencia de secuencias microsatélites aisladas de los géneros de palmas *Bactris*, *Oenocarpus* y *Phoenix* hacia *Ceroxylon echinulatum*, no fue exitosa. De los 61 microsatélites probados, 16 dieron una señal positiva de amplificación. De éstos ninguno se mostró polimórfico en las pruebas hechas en poliacrilamida. En la tabla 2 se describe los microsatélites probados y el resultado que se obtuvo para cada uno de ellos.

Los microsatélites aislados y descritos por Gaitán (2003) para *Ceroxylon sasaimae* y *C. alpinum* dieron resultados positivos en su transferibilidad hacia *Ceroxylon echinulatum*. Los 21 pares de secuencias (primers) escogidos fueron probados bajo condiciones estandarizadas en el laboratorio, las mismas que se basaron inicialmente en Gaitán (2003) (tabla 3). Con excepción del primer *Cs9* la amplificación fue positiva para todos. De estos solo siete fueron

recuperados como loci polimórficos para *Ceroxylon echinulatum* (el 33,3% de los microsatélites probados); mientras que los 13 restantes fueron monomórficos. En la tabla 4 se describen los resultados para cada microsatélite probado.

6.4. AMPLIFICACIÓN DE LOCI POLIMÓRFICOS EN TODAS LAS MUESTRAS PARA ANÁLISIS POBLACIONAL.

Una vez seleccionados los microsatélites polimórficos se realizó la amplificación de todos los individuos de cada población. Las muestras amplificadas fueron corridas primero en geles de agarosa al 1,5% tomando muestras al azar y se determinó la calidad del amplificado, para todos los microsatélites hubo amplificación a pesar de la condición degradada del ADN (figura 3). Cada microsatélite resultó encontrarse en un tamaño cercano al esperado. En la figura 4 se observa un gel de poliacrilamida resultante con las amplificaciones del microsatélite *Ca13* en todas las muestras de la población Nanegalito (bosque alterado), en este se observa los dos alelos presentes en esta población y la variación genotípica (homocigosis o heterocigosis) de cada individuo.

La identificación de los alelos presentes en cada población se realizó después de (a) la estandarización de los protocolos de amplificación, (b) la amplificación de todas las muestras con cada uno de los microsatélites polimórficos y (c) la corrida de las amplificaciones obtenidas en geles de poliacrilamida por electroforesis. Mientras algunos microsatélites eran de fácil lectura en los geles de poliacrilamida, otros presentaban algunas dificultades debido a la presencia de bandas no específicas o slippage, lo cual podían confundir la información

alélica encontrada. Para los microsatélites que presentaban problemas de lectura se los volvió procesar con el objeto de clarificar los datos dudosos.

6.5. TABULACIÓN DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

Los datos fueron ordenados en una matriz alélica (basada en el tamaño de los alelos) presentes en cada individuo para cada microsatélite, obteniendo una matriz normalizada con los datos de las 120 muestras (tabla 1). La matriz fue transformada mediante el programa MSTools (Park, 2001) para que esta pueda ser analizada mediante los programas Arlequin 3.11 (Excoffier, 2007), FStat (Goudet, 2002) y GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006) obteniendo de estas manera diversas estimaciones en los análisis poblacionales.

6.5.1. DESEQUILIBRIO LIGADO E INDEPENDENCIA ENTRE MICROSATÉLITES (LOCI).

Los análisis de desequilibrio ligado (linkage disequilibrium) mostraron que ninguno de los pares de microsatélites se encuentra ligado ($P > 5\%$ y $P > 1\%$) (tabla 5). Los alelos de cada microsatélite estudiado se segregan independientemente en la población. De esta manera también se puede observar que las frecuencias alélicas para cada población y subpoblación varían independientemente entre sí (figura 5).

6.5.2. CUANTIFICACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.

Con los datos proporcionados por los siete microsatélites para todas las muestras, se realizaron los análisis estadísticos para determinar la diversidad genética en cada población (Nanegalito y Mindo) y subpoblación (plántulas y adultos dentro de cada población). De esta manera, se analizó: el número de alelos (absoluto, A_o), la riqueza alélica (R_s) y la diversidad génica (heterocigosidad esperada, H_e) como parámetros de diversidad para cada uno de los grupos descritos.

En base al número absoluto de alelos (A_o) a nivel poblacional, la población de Nanegalito (bosque alterado) presentó mayor número de alelos que Mindo (bosque no alterado) (tabla 6). Particularmente en los microsatélites *Ca20* y *Cs24* Nanegalito tiene más alelos que Mindo; de igual forma se encontraron un mayor número de alelos únicos en la población de Nanegalito (tabla 6 y 7). Los alelos únicos también se expresan como frecuencias alélicas bajas en cada subpoblación y población en particular (figura 5).

Tomado en cuenta el número de alelos absolutos a nivel de subpoblaciones (tabla 7) se observa que los adultos de Mindo tienen el menor número de alelos. Además otra particularidad importante es que para el locus *Cs5* la subpoblación de plántulas de Nanegalito se muestra monomórfica, presentándose un solo alelo (alelo 210).

El otro estimador de la diversidad genética utilizado fue la riqueza alélica (R_s), el cual se basa en el número promedio de alelos (Goudet, 2002; Freeland 2005). En la figura 6 se observa la variación que existe en el número promedio de alelos entre cada subpoblación por cada

microsatélite; de esta manera, se observa una variación importante para el microsatélite *Ca20*, donde los adultos de Mindo son los que poseen el valor más bajo; mientras que las plántulas de Mindo son las que tienen el número más alto de alelos promedio (9,0); en Nanegalito los valores obtenidos fueron de 8,681 (plántulas) y 8,81 (adultos) (tabla 8).

En cuanto a la riqueza alélica total para cada subpoblación (figura 7, tabla 8), comparando la variación entre las subpoblaciones de una misma población, se evidencia que existe una riqueza mayor en los adultos de Nanegalito en comparación a las plántulas de la misma población (diferencia de 2,521 alelos). Mientras que, en Mindo sucede una relación inversa entre plántulas y adultos (diferencia de 1,866 alelos) a lo observado en Nanegalito, pero aún así esta diferencia es menor en Mindo que en Nanegalito (1,866 vs. 2,521 alelos). En términos generales, la población de Nanegalito (bosque alterado) tiene un mayor valor de riqueza alélica que Mindo (bosque no alterado).

Los resultados obtenidos para la diversidad génica confirman la tendencia de una mayor diversidad en Nanegalito. En la figura 8 se observa los valores de diversidad génica de todas las subpoblaciones por cada microsatélite, mientras que en la figura 9 se observa la relación de los valores de diversidad génica desglosados para cada población con sus respectivas subpoblaciones. La diversidad varía entre cada subpoblación independientemente sin una tendencia clara entre las cuatro subpoblaciones, aunque la diversidad es levemente mayor para Nanegalito en comparación con Mindo. Hay dos rasgos importantes como poblaciones, la primera en el microsatélite *Ca13*, se observa una clara diferencia donde existe una mayor diversidad en Nanegalito en comparación a Mindo y la otra particularidad es lo encontrado en el microsatélite *Cs5* donde Mindo es más diverso que Nanegalito.

Observando las subpoblaciones dentro de cada población (figura 9) se distingue que para Nanegalito existe una tendencia hacia la reducción de la diversidad desde adultos hacia plántulas; mientras, en Míndo no existe una tendencia entre plántulas y adultos, los valores de diversidad génica no varían notoriamente entre plántulas y adultos.

6.5.3. ANÁLISIS POBLACIONALES, ESTADÍSTICOS – *F* Y ENDOGAMIA.

Para calcular los Estadísticos – *F* se excluyó al microsatélite *Ca20* ya que este presentaba un alto porcentaje homocigosis.

El primer parámetro a ser analizado fue el coeficiente de endogamia (F_{is}) dentro de las subpoblaciones dentro de cada población. En los resultados obtenidos (figura 10) para cada subpoblación, se observó que existe un alto coeficiente de endogamia en las plántulas de Nanegalito, superando el valor de 0,25. En las otras subpoblaciones no hay un coeficiente alto, siendo los valores de Míndo los más cercanos al equilibrio (cerca a 0), mientras que los adultos de Nanegalito tienen un valor elevado pero no llega a un valor de depresión endogámica.

El coeficiente de endogamia a nivel poblacional (figura 10) para ambas poblaciones, indica que no hay depresión endogámica en Nanegalito ni en Míndo. Aunque en Nanegalito con un valor de $F_{is} = 0,204$ se encuentra cerca del límite de depresión endogámica.

Otro estimador utilizado para analizar la dinámica de cada subpoblación y de cómo se relacionan entre sí fue el de diferenciación genética o índice de fijación (F_{st}). En la figura 11 y

en la tabla 9 se observa la diferenciación que existe entre cada par de subpoblaciones basados en el índice de fijación (F_{st}) con el respectivo valor entre ellos, como se observa las plántulas y adultos de la misma población muestran valores muy cercanos a cero entre sí (Mindó: 0,007; Nanegalito: 0,009). Por otro lado, a pesar de ser calculado de diferente manera, la distancia genética de Nei demuestra el mismo patrón que el índice de fijación (figura 12, tabla 9).

6.5.4. COMPARACIONES POBLACIONALES Y DISTANCIA GENÉTICA.

Para la comparación entre cada subpoblación, el AMOVA demostró que no existen diferencias significativas para ninguna de las subpoblaciones en las variables de diversidad (número de alelos, riqueza alélica y diversidad génica), pero se observa que existe una diferencia significativa para el parámetro de heterocigotos observados en las plántulas de Nanegalito lo que refleja un déficit de heterocigosis y por lo tanto eso incrementa la endogamia dentro de esta subpoblación. Adicionalmente, el AMOVA demuestra que para la única subpoblación que tiene un coeficiente de endogamia significativo corresponde a las plántulas de Nanegalito, lo que concuerda con el resultado descrito en la sección anterior donde se determina estadísticamente que esta subpoblación se encuentra bajo depresión endogámica. El F_{st} y la distancia genética de Nei, indican que no existen diferencias significativas entre las cuatro subpoblaciones designadas para esta investigación (tabla 10).

En la comparación entre las poblaciones totales (Mindó y Nanegalito), el AMOVA determinó que no existen diferencias significativas en la riqueza alélica en ambas poblaciones (R_s) ni en los heterocigotos esperados (diversidad génica, H_e), por lo tanto la diversidad es estadísticamente similar en ambos bosques (tabla 11). Sin embargo, el parámetro de

estructuración genética (F_{st}) y de relación genética (distancia genética de Nei) sustentan el resultado anterior ya que se demuestra que no hay diferencias significativas entre los dos bosques (tabla 11). Además para el coeficiente de endogamia se observa que ninguna de las dos poblaciones es significativa, sin embargo Nanegalito está cerca de llegar al límite pero este valor elevado es aportado por las plántulas de esta población las cuales como subpoblación demostraban un coeficiente de endogamia significativo.

Los datos del AMOVA mostraron que la mayor variabilidad genética se registra a nivel de individuos (94% y 96%) y no entre poblaciones o subpoblaciones (figura 13 y 14). Este resultado es concordante con los resultados obtenidos para la relación genética entre poblaciones y subpoblaciones (F_{st} y distancia de Nei), los cuales sugieren que no existe diferenciación genética entre ninguno de los grupos analizados.

7. DISCUSIÓN

7.1. EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE RAÍZ.

Se describe a la parte apical de la raíz en crecimiento, como una zona con alta actividad celular (alta tasa de mitosis); por esta razón este tejido ha sido utilizado para llevar a cabo el cariotipaje (conteo de cromosomas) de varias especies vegetales, demostrando que es una región rica en ADN (Patau y Srinivasachar, 1959; Dun *et al.*, 2008). Debido a estas condiciones encontradas en el tejido apical de la raíz, se prefirió por realizar el muestreo de las raíces en los individuos adultos para la extracción de ADN, además de que se encuentran como raíces adventicias fácilmente visibles y no se confunden con raíces de otras plantas.

7.2. EVALUACIÓN DE LA TRANSFERIBILIDAD DE MICROSATÉLITES Y RESULTADOS NEGATIVOS.

Las pruebas de transferibilidad de microsatélites (descritos para *Bactris*, *Oenocarpus* y *Phoenix*) hacia *C. echinulatum*, en su mayoría mostraron resultados negativos, y los pocos microsatélites que dieron señal positiva de amplificación, fueron monomórficos. Estos resultados pueden explicarse debido al grado de relación genética de *C. echinulatum* con respecto a los otros géneros (anexo 5). La relación genética entre *Bactris*, *Oenocarpus* y *Phoenix* con respecto a *C. echinulatum* debe ser tomado en cuenta para el entendimiento de estos resultados, ya que estas taxa a pesar de estar agrupados dentro de la misma familia (Arecaceae) presentan importantes diferencias evolutivas a nivel de subfamilias (anexo 5).

Posiblemente los loci que no amplificaron podrían deberse a mutaciones (producidas durante la evolución de *C. echinulatum*) en los sitios de anillamiento de los primers, lo que impide la amplificación del fragmento (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004; Watson, 2007). Por otro lado, los que sí amplificaron muestran que aún existen zonas conservadas dentro del genoma nuclear que son compartidas entre estos géneros (con respecto a *Ceroxylon*); sin embargo, al ser monomórficos, muestran que durante la evolución de *C. echinulatum* hubo la fijación de alelos, perdiendo de esta manera la variabilidad en esos loci en particular dentro de la especie (Barbará *et al.*, 2007; Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Resultados similares fueron reportados por Trénel (2007) en relación a las amplificaciones de microsatélites. Trénel (2007) realizó pruebas con el set de microsatélites descritos para *Phoenix dactylifera* (n=16; Billote *et al.*, 2004a) y para *Bactris gasipaes* (n=18; Billote *et al.*, 2004b), en poblaciones de *C. echinulatum* de la región andina del Ecuador, obteniendo como resultado la recuperación de solo un microsatélite informativo a partir de cada set de microsatélites descrito para cada especie (*B. gasipaes* y *P. dactylifera*). Estos resultados junto a los resultados obtenidos en la presente investigación, sustentan la hipótesis de que existe una importante diferenciación genética entre estas taxa, sea por: a) la fijación de alelos y/o b) mutaciones en los sitios de anillamiento (Barbará *et al.*, 2007).

Por otro lado, el alto porcentaje de transferibilidad (95,2%) de los microsatélites probados descritos por Gaitán (2003), podría ser explicado por la proximidad filogenética entre especies dentro de un mismo género; sin embargo, el bajo porcentaje de polimorfismo de los mismos

(33.3%) se explicaría por el grado de diferenciación genética a nivel interespecífico (Barbará *et al.*, 2007; Freeland, 2005; Varshney *et al.*, 2005).

7.3. *Ceroxylon echinulatum*: UN MODELO BIOLÓGICO ACOPLADO AL MODELO TEÓRICO DE HARDY – WEINBERG.

Una población está acoplada al modelo de equilibrio Hardy – Weinberg (EHW) si ésta cumple con las condiciones básicas de este principio, es decir que exista (i) apareamiento al azar, (ii) que no actué ningún tipo de selección sobre la población ni sobre el carácter a estudiar y (iii) que los caracteres tomados en cuenta se segreguen independientemente (herencia mendeliana) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Teóricamente *C. echinulatum* es una especie que por su biología se podría acoplar a este modelo, debido a que (1) es una especie dioica y por lo tanto no existe autofecundación, (2) la reproducción es al azar (panmixia), (3) en teoría no existe selección en los caracteres usados (microsatélites) y (4) como se evidenció en el análisis de desequilibrio ligado, todos los microsatélites se distribuyen al azar e independientemente entre sí (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004; Peakall y Smouse, 2006). De esta manera, el acoplamiento de datos al modelo Hardy – Weinberg fue determinado mediante los valores de probabilidad que se obtuvo de cada microsatélite por cada subpoblación, de esta manera globalmente se observó que todos los microsatélites se acoplaban al modelo, lo cual corrobora que las poblaciones analizadas cumplen las condiciones teóricas para acoplarse al EHW. La importancia de que las subpoblaciones se acoplen a este modelo es que nos permiten predecir según los resultados obtenidos de los análisis cual será el posible futuro de las poblaciones estudiadas y bajo las

tendencias de una población particular determinar los posibles escenarios a los que se pueda enfrentar (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

7.4. LA DIVERSIDAD GENÉTICA COMO UN REFLEJO DE LAS INTERACCIONES ECOLÓGICAS Y CONDICIÓN DEL HABITAT.

Los análisis de diversidad genética, basándose en todos los parámetros analizados (número de alelos, riqueza alélica y diversidad génica), demuestra que la población de bosque alterado (Nanegalito) es más diversa que la población de bosque no alterado (Mindo) pero esta diferencia no es estadísticamente significativa; estos datos sugieren que ambas poblaciones (Nanegalito y Mindo) tienen una dinámica y una identidad alélica similar pero no idéntica, ya que existe diferenciación pero esta no es significativa (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). La mayor diversidad (aunque no significativa) del bosque alterado (Nanegalito) puede estar dada por varios factores, sea por: 1) un efecto de muestreo (Freeland, 2005); ó 2) que la población se podría estar beneficiando de un flujo multidireccional con poblaciones circundantes dado por su posición geográfica (Eckert *et al.*, 2009).

Bajo el supuesto de muestreo, el problema podría deberse a que el muestreo no es significativo (es decir, que no representan a la población) o porque las muestras fueron tomadas en un mismo punto limitando posibilidades de variación (Lowe *et al.*, 2004), Aunque para esta investigación se planteó un modelo experimental para evitar errores de muestreo, sea tomando un número significativo de muestras para cada subpoblación como muestreando individuos que se encuentren distanciados, no se puede evitar totalmente el error de muestreo. Además,

en ambos tipos de bosque se aplicó exactamente el mismo modelo experimental lo que baja aún más cualquier error de muestreo.

Bajo el supuesto de un flujo multidireccional, la localidad tomada como bosque alterado (Nanegalito), corresponde a una población de *C. echinulatum* geográficamente central en función de su área de distribución dentro de las estribaciones del occidente de Pichincha, ya que se encuentra rodeada por otras localidades donde también se encuentra esta especie como son Nanegal, Pacto, Tandayapa, Gualea, entre otras. La posición geográfica de Nanegalito podría explicar parcialmente la mayor diversidad que presenta esta población. Por otro lado, Mindo se encuentra en una posición marginal geográficamente dentro de su área de distribución, limitando de esta manera las posibilidades de flujo génico con otras poblaciones. La posición geográfica de ambas poblaciones (Nanegalito y Mindo) podría estar explicando parcialmente las variaciones en los parámetros de diversidad (Marquardt y Epperson, 2004; Trénel, 2007).

Los resultados obtenidos por Trénel (2007), demuestran que la diversidad genética de las poblaciones de *C. echinulatum* puede estar influenciada por la posición espacial (geográfica) donde se encuentran una población particular con respecto a otras poblaciones vecinas. Siendo esta una investigación exploratoria de la problemática de las poblaciones de *C. echinulatum* (donde solo se comparan dos poblaciones y dos estadios generacionales), se observó que la diversidad entre estas poblaciones (Nanegalito y Mindo) no tiene variaciones significativas, pero aún así una población es más diversa (Nanegalito) que la otra (Mindo). Determinar si la posición geográfica puede estar alterando la diversidad genética de una población particular, podría ser una herramienta eficaz para establecer zonas prioritarias y plantear un mejor manejo

para la conservación manipulando las vías de flujo génico para el enriquecimiento de la base genética de una población amenazada.

En cuanto a la diversidad genética entre las subpoblaciones (plántulas vs. adultos), el rasgo más importante a destacar es la condición de las plántulas del bosque alterado (Nanegalito) con respecto a los adultos de la misma población. De esta manera, en todos los parámetros de diversidad (numero de alelos, riqueza alélica y diversidad génica), las plántulas muestran una tendencia a la pérdida de diversidad. Actualmente, la reducción de la diversidad genética no es significativa; pero si esta tendencia se mantuviera, dentro de algunas generaciones la diferencia de la diversidad entre generaciones podría llegar a ser significativa (Beebee y Rowe, 2008; Eckert *et al.*, 2009; Freeland, 2005; Leberg y Firmin, 2008; Lowe *et al.*, 2004; Wright, 1951). La pérdida de la diversidad en el bosque alterado (Nanegalito) es un producto del impacto humano sobre las poblaciones de *C. echinulatum* en esta zona. La pérdida de la diversidad en las nuevas generaciones puede afectar a las poblaciones principalmente de dos formas, siendo por (1) la pérdida de la plasticidad genética de la población reduciendo así la capacidad de enfrentarse y sobrevivir a cambios ecológicos y climáticos, o por (2) la expresión de genes deletéreos que den lugar a individuos no viables (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Leberg y Firmin, 2008; Lowe *et al.*, 2004).

7.5. NIVELES DE ENDOGAMIA EN LAS POBLACIONES DE *Ceroxylon echinulatum*.

Para los análisis de Estadísticos – F (endogamia, F_{is} , e índice de fijación, F_{st}), se excluyó al microsatélite *Ca20* ya que este presentaba un alto porcentaje homocigosis. Esto sugiere que existe algún tipo de mutación en las secuencias complementarias de los primers, evitando así

la amplificación del locus (microsatélite) en ciertas muestras; lo que permite determinar que en este locus existen alelos nulos para las poblaciones analizadas. La presencia de alelos nulos puede alterar los resultados de los Estadísticos – F presentando datos erróneos en los cálculos, pero esos datos inconclusos no afectan a las estimaciones de diversidad debido a que casi todas las muestras presentaban al menos un alelo y por esta razón no se excluyó al microsatélite *Ca20* para los análisis de diversidad previamente descritos (Freeland, 2005; Varshney *et al.*, 2005).

El impacto humano podría estar relacionado con los niveles de endogamia de cada grupo en particular. Fue evidente la condición en la que se encuentra la subpoblación de plántulas del bosque alterado (Nanegalito), la cual está representando a las condiciones ecológicas actuales de la zona (ecosistema degradado). Para esta subpoblación (plántulas de Nanegalito), los valores de endogamia son estadísticamente significativos, determinando que la subpoblación se encuentra bajo depresión endogámica (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004; Wright, 1951). Esto teóricamente implica que las nuevas generaciones tienen una marcada tendencia a bajar su aptitud biológica debido a que la endogamia seguirá incrementándose; y como producto de eso la diversidad genética disminuirá al mismo tiempo (Kelly *et al.*, 2004; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2005; Reed, 2009). En la población de bosque alterado (Nanegalito), ya se observa una tendencia a la pérdida de diversidad, lo que puede ser producto de este alto nivel de endogamia, la pérdida de la diversidad podría incrementarse con las futuras generaciones hasta erosionar su base genética, siendo este un indicio importante de la condición actual del ecosistema de Nanegalito y que permite determinar el grado de prioridad para su conservación (Beebee y Rowe, 2008).

Para *C. alpinum*, cercanamente relacionado con *C. echinulatum*, Gaitán (2003) obtiene resultados similares para los niveles de endogamia en un hábitat alterado. En esta investigación, se observa que en los tres estadios que se analizaron (plántulas, juveniles y adultos), existe una tendencia al incremento de la endogamia desde los adultos hacia las plántulas y una pérdida de la diversidad en el mismo sentido, aunque ninguno de los parámetros fue significativo, Gaitán expresa que estas tendencias no deben ser despreciadas ya que en futuras generaciones la tendencia podría volverse significativa.

Datos ecológicos obtenidos dentro del proyecto “Historia natural de *Ceroxylon echinulatum*” (Ecofondo – PUCE) sobre las poblaciones de Nanegalito y Mindo, permiten tener una visión integral y sustentada de la problemática actual al complementarse a los análisis genético. El bosque de Nanegalito (bosque alterado) presenta una alta densidad de individuos de *C. echinulatum* en estadios tempranos (plántulas y juveniles) distribuidos en grupos compactos alrededor de un individuo hembra; característica que no se observa en Mindo (bosque no alterado), donde los individuos adultos se encuentran distantes y el número de individuos en los demás estadios (plántulas y juveniles) es más bajo. Interpretando los resultados de los análisis genéticos junto con la dinámica poblacional de la especie; se deduce que en bosque alterado (Nanegalito) la alta densidad de individuos que se encuentran creciendo juntos promueve el entrecruzamiento entre individuos potencialmente emparentados, incrementando de esta manera el nivel de endogamia en el bosque alterado (Nanegalito) donde ya se encuentran desequilibrios poblacionales (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Mientras que en el bosque no alterado (Mindo), los individuos adultos al encontrarse bastante separados aumentan la probabilidad de que un individuo adulto comparta su material genético con otro adulto que no esté emparentado; la distancia entre individuos en los demás

estudios demuestra que existe interacciones ecológicas como predación y dispersión que evitan que los individuos crezcan cerca de sus parentales (Freeland, 2005). De esta manera vemos que las interacciones ecológicas y, consecuentemente, genéticas en un bosque alterado (Nanegalito) han sido afectadas como producto de la actividad humana; lo que no sucede en un bosque no alterado (Mindo), donde procesos como polinización, predación y dispersión no han sido afectados y se mantiene un balance poblacional estable.

Similares resultados e ideas fueron reportados por Mimura *et al.* (2009) en *Eucalyptus globulus*, donde se compara poblaciones en bosques continuos y fragmentados. En esta investigación los resultados demostraron que en ambas condiciones (bosques continuos y fragmentados) la densidad de individuos fue similar, sin embargo las poblaciones que se desarrollaban en bosques fragmentados tenían un mayor nivel de endogamia debido a la reproducción entre individuos emparentados y se observó una pérdida de alelos en las plántulas de esas poblaciones. Lo contrario es observado en las poblaciones de bosques continuos, en donde los niveles de endogamia fueron menores. Los resultados de Mimura *et al.* (2009) sugieren que la continuidad del bosque incrementa la recombinación entre individuos adultos para formar nuevos genotipos. De igual manera, Kettle *et al.* (2007) descubre una relación semejante entre hábitats degradados (bosques alterados) para *Araucaria nemorosa* donde los datos demostraron una marcada diferenciación genética por la pérdida de diversidad y fijación de alelos entre las plántulas y los adultos.

Con la finalidad de recuperar la base genética de las poblaciones que se encuentran bajo altos niveles de endogamia, se puede proponer como un plan de recuperación de la variación genética, la inclusión de individuos de poblaciones geográficamente alejadas con respecto a la

población específica para incluir alelos diferentes al pool genético de esta zona (Freeland, 2005; Leberg y Firmin, 2008). Adicionalmente, se podría manipular las vías de flujo génico mediante forestación dirigida con el fin de aumentar la recombinación genética entre individuos de las poblaciones circundantes lo cual podría posiblemente aumentar la heterocigocidad en la población y bajar los niveles endogamia (Eckert *et al.*, 2009; Freeland, 2005).

7.6. POCAS VARIACIONES EN LA RELACIÓN GENÉTICA ENTRE SUBPOBLACIONES Y POBLACIONES DEBIDO A UN FLUJO GÉNICO TODAVÍA EXISTENTE.

Basado en el F_{st} (índice de fijación) se demostró que no hay ninguna estructuración genética y que las poblaciones (Nanegalito y Mindo) y subpoblaciones (plántulas y adultos para cada población) no se encuentran diferenciadas. Las plántulas y adultos de una misma población muestran valores muy cercanos a cero entre sí (Mindo: 0,007; Nanegalito: 0,009) esto se debe a que al estar dentro de la misma población existe relación directa entre plántulas y adultos dando una leve variación en la fijación de alelos; sin embargo se puede evidenciar que existe una mayor diferenciación en Nanegalito entre plántulas y adultos, lo cual podría ser explicado a que el impacto humano dentro de esta zona ha provocado una fijación de alelos acelerada lo que puede ser sustentado por el alto nivel de endogamia encontrado en las plántulas de Nanegalito, por lo tanto el impacto humano acelera el grado de diferenciación entre generaciones dentro de una misma población (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004; Wright, 1951). Por otro lado, se observa que a pesar que la diferenciación genética es leve entre Mindo y Nanegalito, los valores son más elevados a lo encontrado entre plántulas

y adultos de una misma población, lo que se interpreta como que ambas poblaciones tienen una dinámica genética independiente, pero aún comparten una base genética común posiblemente debido a que no se ha perdido la base genética de la población ancestral (Freeland, 2005).

En la comparación entre poblaciones y subpoblaciones mediante el AMOVA, se observa que las variaciones más importantes se dan entre individuos, más no entre grupos. Un 4% de la variación genética (AMOVA) es explicado por la variación entre grupos y un 96% por la variación dentro de grupos. Bajo los parámetros analizados, este resultado sugiere que todas las subpoblaciones se encuentran compartiendo una similar base genética, a pesar de que los niveles de alteración o impacto humano a los que estén expuestos sean diferentes. Al no haber una diferenciación surge la siguiente pregunta: ¿cuál es la ruta de flujo génico para que estas dos poblaciones (Mindó y Nanegalito), que están relativamente alejadas, puedan compartir su información genética y mantengan esa estrecha relación o acaso la longevidad de los individuos de esta especie permite mantener la base genética ancestral?. Lo mismo se observa en los resultados de la distancia genética de Nei, pero a diferencia del índice de fijación, la distancia genética de Nei se basa en la identidad alélica, mas no en la probabilidades de fijación de alelos (Lowe *et al.*, 2004). Por eso, la distancia genética de Nei aparte de corroborar los resultados observados con el índice de fijación también da una relación clara entre las subpoblaciones mostrando que todas se encuentran estrechamente relacionadas con valores de cero o casi cero denotando que podría existir flujo génico entre la poblaciones (Beebe y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

En los resultados obtenidos por Gaitán (2003) para determinar si existe estructuración genética en la población de *C. echinulatum* que analizó, observa que no existe una diferenciación ni estructuración genética entre las poblaciones (compartían una misma base genética), lo que le permite determinar que existe alguna forma de flujo génico entre las poblaciones y que los individuos de esta especie pueden mantener contacto a pesar de la distancia y de la degradación del hábitat. Sin embargo, la estructuración podría estar influenciada por el largo ciclo de vida de esta especie, haciendo que cualquier variación no se pueda expresar en tan solo unos 50 años; por otro lado, el flujo génico de estas poblaciones todavía puede existir debido a que no se ha roto la interacción ecológica con polinizadores lo que promovería el entrecruzamiento entre individuos lejanos y de esta manera compartir el mismo pool genético. De esta manera, al encontrar resultados similares para *C. echinulatum* es importante determinar si existe o no flujo entre las poblaciones estudiadas y, de existir, como está siendo influenciado este flujo.

Para la presente investigación se podría pensar que la estrecha relación genética bajo los dos parámetros analizados (F_{st} y distancia genética de Nei) demuestra que ambas poblaciones (Nanegalito y Mindo) formaron, tal vez, históricamente parte de una sola gran población dentro de bosque continuo, formando de esta manera una misma base genética (Marquardt y Epperson, 2004), pero en la actualidad ese bosque continuo ha sido fragmentado y degradado disminuyendo de esta manera las posibilidades de flujo génico entre Mindo y Nanegalito; vías que sí son interrumpidas, en un futuro daría como resultado una estructuración marcada entre las dos poblaciones por la fijación de alelos e identidad alélica (Freeland, 2005; Kettle *et al.*, 2007). Descubrir las actuales vías de comunicación para el flujo génico podría determinar un punto importante para la recuperación de la endogamia en las poblaciones actuales de

Nanegalito, ya que al manipular esta brecha de comunicación con el objeto de incrementar el flujo génico se podría aumentar la heterocigosis en la población promoviendo la reproducción con individuos más lejanos genéticamente (Eckert *et al.*, 2009; Freeland, 2005; Leberg y Firmin, 2008).

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Esta investigación demostró que la actividad humana afecta la estructura genética de la población de *C. echinulatum* en Nanegalito (bosque alterado). Por otro lado, la población de Mindo (bosque no alterado) ha mantenido una estructura estable entre las generaciones analizadas (plántulas y adultos) puesto que sus variaciones han sido mínimas debiéndose posiblemente al constante flujo genético producto de la baja actividad humana en la zona.

La población de Nanegalito (bosque alterado) presentó, aunque no significativamente, más alelos y por lo tanto más diversidad que Mindo (bosque continuo), contrario a lo que se esperaría teóricamente. Esta variación de la diversidad puede deberse al número de individuos muestreados o a la posición biogeográfica de las poblaciones, lo cual sería un punto importante a probar en una futura investigación.

Los cálculos demostraron que la población actual de Nanegalito (bosque alterado) se encuentra bajo depresión endogámica, lo que pone a esta en una situación prioritaria para su manejo, ya que a pesar de que se presentó una mayor diversidad, podría estar predispuesta a perderla a una tasa acelerada por generación producto del alto nivel de endogamia. Una alta endogamia y la pérdida en la diversidad pueden conllevar a la reducción de la plasticidad genética de la población disminuyendo así la capacidad de adaptarse a nuevas variaciones ecológicas y/o climáticas, y además daría lugar a la expresión de genes deletéreos (enfermedades hereditarias y caracteres letales) bajando aún más el número de individuos en la población.

La población de Nanegalito (bosque alterado) al tener una mayor diversidad y a la vez un alto coeficiente de endogamia, se sugiere la creación de un proyecto de inclusión de individuos de poblaciones geográficamente distantes para que de esta manera se pueda mantener la diversidad y aumentar la recombinación, y consecuentemente reducir la endogamia.

Se concluye que la alta variación que se tiene entre las dos generaciones analizadas (plántulas y adultos), indica que el hábitat ha cambiado mucho en aproximadamente 80 años, lo que correspondería aproximadamente la diferencia temporal entre ambas generaciones (Bernal, 2007), pero para tener una apreciación efectiva de la dinámica del hábitat a nivel genético, sería recomendable analizar otras generaciones intermedias lo cual ayudaría a determinar las tendencias en las variaciones de cada población.

Poblaciones disturbadas como Nanegalito, que ya se encuentra alteradas tanto ecológica como genéticamente, se las sugiere declarar como zonas de explotación bajo manejo responsable del recurso. Mientras que las poblaciones como Mindo (bosques maduros o no alterados) se las deberían declarar como zonas protegidas y de esta manera rescatar las poblaciones naturalmente viables (sin desequilibrios poblacionales), tanto por sus condiciones ecológicas como genéticas.

Esta investigación generó resultados directos y concluyentes con la variables tomadas en cuenta, estos deberían ser sustentados mediante la utilización de otros marcadores moleculares así como con la inclusión de otras poblaciones que se encuentren dentro de la zona del occidente de Pichincha, para de esta manera evidenciar con mayor precisión la condición existente (tanto histórica como proyectada a futuro) de las poblaciones y poder manejar a C.

echinulatum de mejor manera con el objeto de conservar a la especie de la amenaza a la cual está sometida.

9. LITERATURA CITADA

- Acosta-Solís, M, 1961. Los bosques del Ecuador y sus productos Ediciones Abya – Yala. Quito, Ecuador.
- Acosta-Solís, M. 1962. Fitogeografía y vegetación de la provincia de Pichincha. Plan piloto del Ecuador. México D. F., México.
- Acosta-Solís, M. 1966. Las divisiones fitogeográficas y las formaciones geobotánicas del Ecuador. Ediciones Abya – Yala. Bogotá, Colombia.
- Asmussen, C., Dransfield, J., Deickmann, V., Barfod, A., Pintaud, J. y Backer, W. 2006. A new subfamily classification of the palm family (Arecaceae): evidence from plastid DNA phylogeny. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 15 – 38.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggi, G., Bered, F., Fay, M. y Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759 – 3767.
- Bargo, F. 2008. Consumo en materia seca en vacas en pastoreo. Conferencia en el 31° Congreso Argentino de Producción Animal. Buenos Aires, Argentina.
- Bawa, K. y Seidler, R. 1998. Natural Forest Management and Conservation of Biodiversity in Tropical Forests. *Conservation Biology* 12(1): 46 – 55.

- Beebe, T. y Rowe, G. 2008. *An Introduction to Molecular Ecology*, Second Edition. Oxford University Press. New York, USA.
- Bernal, M. 2007. El patrón de crecimiento de la palma de cera (*Ceroxylon quindiuense*). Trabajo de grado presentado para optar al título de Biólogo. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia.
- Biggs, T., Dunne, T. y Martinelli, L. 2004. Natural Controls and Human Impacts on Stream Nutrient Concentrations in a Deforested Region of the Brazilian Amazon Basin. *Biogeochemistry* 68(2): 227 – 257.
- Billotte, N., Couvreur, T., Marseillac, N., Brottier, P., Perthuis, B., Vallejo, M., Noyer, J., Jacquemoud-Collet, J., Risterucci, A. y Pintaud, J. 2004a. A new set of microsatellite markers for the peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth); characterization and across-taxa utility within the tribe Cocoeae. *Molecular Ecology Notes* 4: 580 – 582.
- Billotte, N., Marseillac, N., Brottier, P., Noyer, J., Jacquemoud-Collet, J., Moreau, C., Chevallier, M., Pintaud, J. y Risterucci, A. 2004b. Nuclear microsatellite markers for the date palm (*Phoenix dactylifera* L.): Characterization and utility across the genus *Phoenix* and in other palm genera. *Molecular Ecology Notes* 4: 256 – 258.
- Borchsenius, F., Borgtoft, H. y Balsev, H. 1998. *Manual to the palms of Ecuador*. Aarhus University Press. Denmark.

- Buschbacher, R. 1986. Tropical deforestation and pasture development. *BioScience* 36(1): 22 – 28.
- Cañadas-Cruz, L. 1983. El mapa bioclimático y ecológico del Ecuador. Banco Central del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Cole, D. 2004. Genetic diversity and population structure of peach palm (*Bactris gasipaes* Kunth) in agroforestry systems of the peruvian amazon. Thesis presented to the graduate school of the University of Florida in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science. Florida, USA.
- Costa, F. y Magnusson, W. 2002. Selective Logging Effects on Abundance, Diversity, and Composition of Tropical Understory Herbs. *Ecological Applications* 12(3): 807 – 819.
- Couvreur, T., Billotte, N., Risterucci, A., Lara, C., Vigouroux, Y., Ludeña, B., Pham, J y Pintaud, J. 2006. Close genetic proximity between cultivated and wild *Bactris gasipaes* Kunth revealed by microsatellite markers in Western Ecuador. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 1361 – 1373.
- Couvreur, T., Hahn, W., Granville, J., Pham, J., Ludeña, B. y Pintaud, J. 2007. Phylogenetic relationships of the cultivated neotropical palm *Bactris gasipaes* (Arecaceae) with its wild relatives inferred from chloroplast and nuclear DNA polymorphisms. *Systematic Botany* 32(3): 519 – 530.

- Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M. y Lewis, C. 2008. *Genera palmarum: The evolution and classification of palms*. Royal Botanic Gardens, Kew. Londres, Inglaterra.
- Dun, K., Welten, V., Poppel, L., Vogelaar, A. y Dirks, R. 2008. A novel non-destructive DNA isolation procedure from plants using root borders cells. *Plant & Animal Genomes XVI Conference*. San Diego, California.
- Eckert, C., Kalisz, S., Geber, M., Sargent, R., Elle, E., Cheptou, P., Goodwillie, C., Johnston, M., Kelly, J., Moeller, D., Porcher, E., Ree, R., Vallejo-Marín, M. y Winn, A. 2009. Plant mating systems in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution* 25(1): 35 – 43.
- Excoffier, L. 2007. Software ARLEQUIN Version 3.11. CMPG, Institute of Ecology and Evolution. Suiza.
- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley y Sons, Ltd. England.
- Gaiotto, F., Grattapaglia, D. y Vencovsky, R. 2003. Genetic structure, mating system, and long-distance gene flow in heart of palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Journal of Heredity* 94(5): 399 – 406.
- Goudet, J. 2002. Software FSTAT Version 2.9.3.2. Institute of Ecology. UNIL. Suiza.

- Gaitán, E. 2003. Obtención y uso de secuencias microsatélites GA/CA en estudios de diversidad genética en las especies de palmas colombianas *Ceroxylon sasaimae*, *Ceroxylon alpinum* y *Attalea amygdalina*. Tesis doctoral en ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Henderson, S., Billotte, N. y Pintaud, J. 2006. Genetic isolation of Cape Verde Island *Phoenix atlantica* (Arecaceae) revealed by microsatellite markers. *Conservation Genetics* 7: 213 – 223.
- Jara-Chávez, H. 2006. Tulipe y la cultura Yumbo: arqueología comprensiva del subtrópico quiteño. FONSAL. Quito, Ecuador.
- Kelly, B., Hardy, O. y Bouvet, J. 2004. Temporal and spatial genetic structure in *Vitellaria paradoxa* (shea tree) in an agroforestry system in southern Mali. *Molecular Ecology* 13: 1231 – 1240.
- Kettle, C., Hollingsworth, P., Jaffré, T., Moran, B. y Ennos, R. 2007. Identifying the early genetic consequences of habitat degradation in a highly threatened tropical conifer, *Araucaria nemorosa* Laubenfels. *Molecular Ecology* 16: 3581 – 3591.
- Leberg, P. y Firmin, B. 2008. Role of inbreeding depression and purging in captive breeding and restorations programmes. *Molecular Ecology* 17: 334 – 343.

- Leblanc, H., Russo, R., Cueva, J. y Subía, E. 2006. Fijación de carbono en palma aceitera en la región tropical húmeda de Costa Rica. *Tierra Tropical* 2(2): 197 – 202.
- Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford – UK.
- Lowe, A., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. y Navarro, C. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255 – 273.
- Marquardt, P. y Epperson, B. 2004. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. *Molecular Ecology* 13: 3305 – 3315.
- Mimura, M., Barbour, R., Potts, B., Vaillancourt, R. y Watanabe, K. 2009. Comparison of contemporary mating patterns in continuous and fragmented *Eucalyptus globules* native forest. *Molecular Ecology* 18: 4180 – 4192.
- Ministerio de Ambiente. 2009. Bosque protector “Mindó – Nambillo”. [En línea]: <
<http://www.ambiente.gov.ec/userfiles/37/file/Bosques%20Protectores/PICHINCHA/BP%20MINDO%20NAMBILLO-.pdf>>
- Montúfar, R., Mariac, C., Pham, J. y Pintaud, J. 2006. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 7(1): 75 – 78.

- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283 – 292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321 – 3323.
- Patau, K. y Srinivasachar, D. 1959. The DNA-content of nuclei in the meristem of onion roots. *Chromosoma* 10: 407 – 429.
- Park, S. 2001. Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection, Software MSTools. Doctorate of Philosophy Thesis. University of Dublin. Ireland.
- Peakall, R. y Smouse, P. 2006. GenAlEx: Genetic Analysis in Excel, Version 6. *Molecular Ecology Notes* 6: 288 – 295.
- Perera, L., Russell, J., Provan, J. y Powell, W. 2000. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Genome* 43: 15 – 21.
- Reed, D. 2009. When it comes to inbreeding: slower is better. *Molecular Ecology* 18: 4521 – 4522.
- Rhoades, R. 2001. *Tendiendo puentes entre los paisajes humanos y naturales*. Ediciones Abya – Yala. Quito, Ecuador.

- Sadeghian, S., Rivera, J. y Gómez, M. 2009. Impacto de sistemas de ganadería sobre las características físicas, químicas y biológicas de suelos en los Andes de Colombia. Conferencia electrónica de la FAO sobre "Agroforestería para la producción animal en Latinoamérica".
- Salomon, F. 1946a. Los señores étnicos de Quito en la época de los Incas. Colección Pendoneros 10. Instituto Otavaleño de Antropología. Otavalo, Ecuador.
- Salomon, F. 1946b. Los Yumbos, Niguas y Tsáchilas o Colorados durante la colonia española: etnohistoria del Noroccidente de Pichincha – Ecuador. Ediciones Abya-Yala. Quito, Ecuador.
- Shapcott, A., Dowe, J. y Ford, H. 2009. Low genetic diversity and recovery implications of the vulnerable Bankoualé Palm *Livistona carinensis* (Arecaceae), from North-eastern Africa and the Southern Arabian Peninsula. *Conservation Genetics* 10: 317 – 327.
- Shelton, N. 1985. Logging versus the Natural Habitat in the Survival of Tropical Forests. *Ambio* 14(1): 39 – 41.
- Sierra, R. 1999. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia. Quito, Ecuador.
- Trénel, P. 2007. Evolutionary studies in the wax palm subfamily (Ceroxyloideae, Arecaceae). Doctorate of Philosophy Thesis. University of Aarhus. Denmark.

Varshney, R., Graner, A. y Sorrells, M. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology* 23(1): 48 – 55.

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

Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M. y Witkowski, J.A. 2007. *Recombinant DNA: Genes and Genomes – A short course*, Tercera Edición. W.H. Freeman and Company, USA.

Zehdi, S., Trifi, M., Billotte, N., Marrakchi, M. y Pintaud, J. 2004. Genetic diversity of Tunisian date palms (*Phoenix dactylifera* L.) revealed by nuclear microsatellite polymorphism. *Hereditas* 141: 278 – 287.

10. FIGURAS

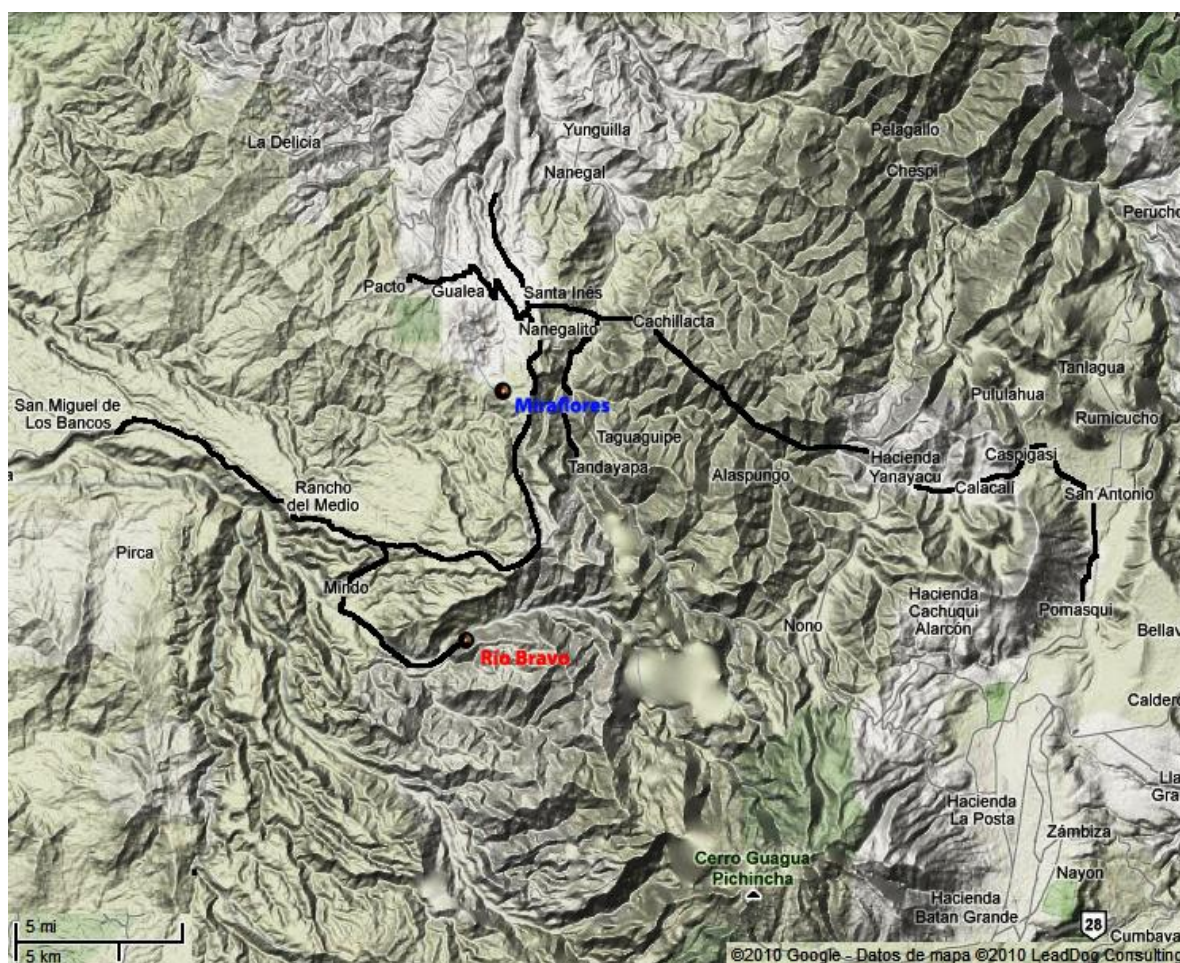


Figura 1. Área de estudio al occidente de Pichincha; cada punto indica las poblaciones muestreadas basadas en coordenadas geográficas, en rojo esta la reserva “Río Bravo” (S $0^{\circ}03'04,29''$; O $78^{\circ}46'41,89''$, población de Mindo) y en azul esta la sector llamado “Miraflores” (N $0^{\circ}4'0''$; O $78^{\circ}40'0''$, población de Nanegalito). Resaltado con negro se encuentran las principales vías de acceso y la distancia entre las dos poblaciones por estas vías es de alrededor de 32 Km.

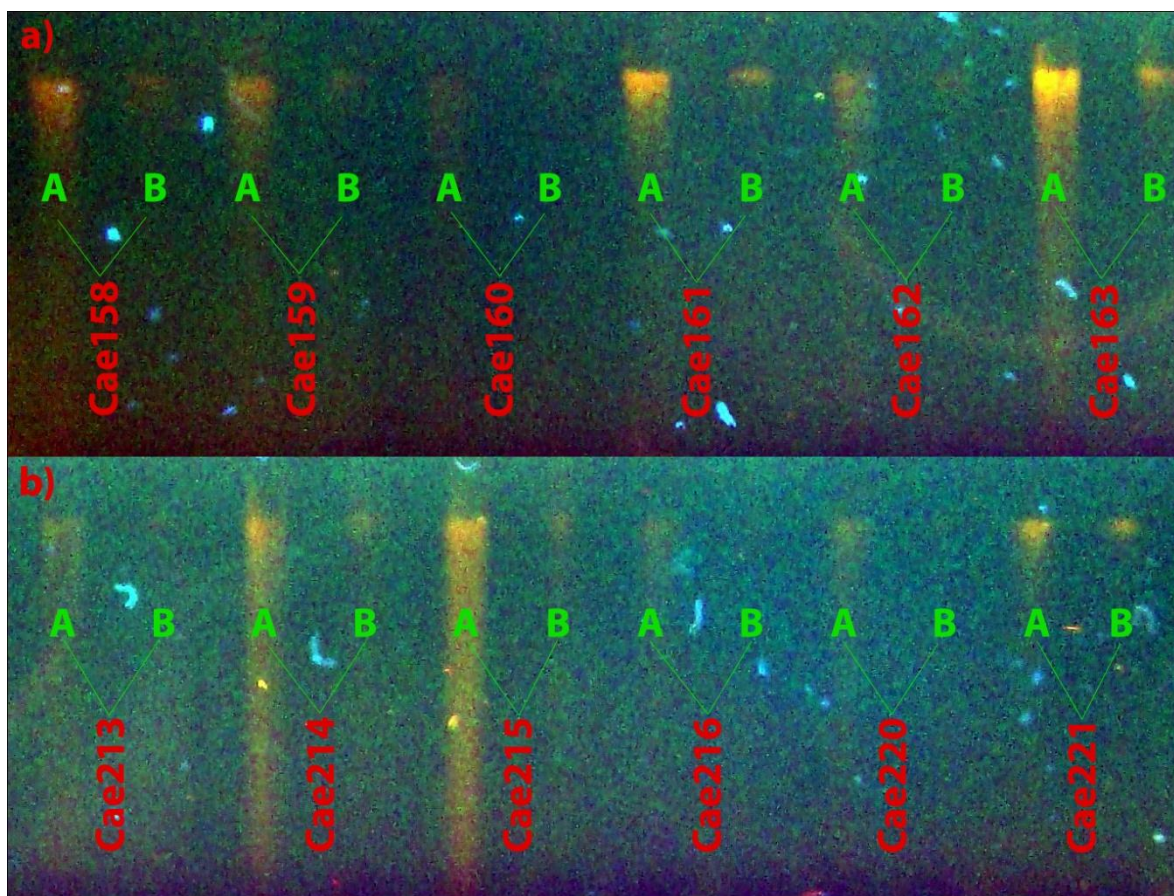


Figura 2. Extracciones de ADN total obtenidas de las muestras de *Ceroxylon echinulatum*. Las muestras corridas en el gel de agarosa al 1% están ordenadas por dilución (A y B), correspondiendo a dos carriles por muestra. Las muestras de la sección superior a) corresponden a plántulas (a partir de cotiledón), por otro lado, las de la sección inferior b) corresponden a muestras de adultos (a partir de raíz).

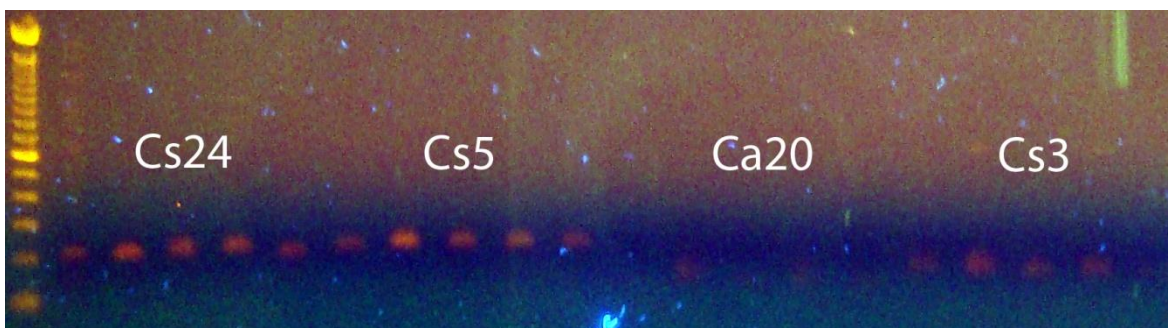


Figura 3. Comprobación de amplificación de 4 locus distintos en 5 muestras escogidas al azar en un gel de agarosa al 1,5%. Encima de cada grupo de cinco muestras se encuentra el respectivo nombre del locus y a la izquierda se encuentra una escalera de tamaños (100 bp DNA Ladder de Invitrogen), en la cual la primera línea visible desde abajo representa a 100bp, la segunda 200bp y así sucesivamente.

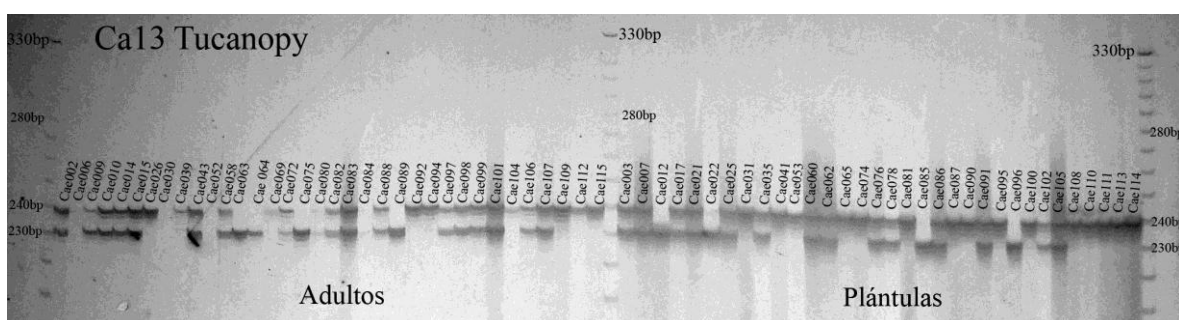


Figura 4. Amplificaciones del locus *Ca13* corridos en un gel de poliacrilamida al 6%. Las muestras corresponden a la población de Nanegalito (Tucanopy). El gel se encuentra dividido en dos secciones, a la izquierda están los adultos y a la derecha las plántulas, y entre cada sección se encuentra una escalera de tamaño (30 – 330 bp AFLP DNA Ladder de Invitrogen). Para este locus solo se encuentran dos alelos para esta población.

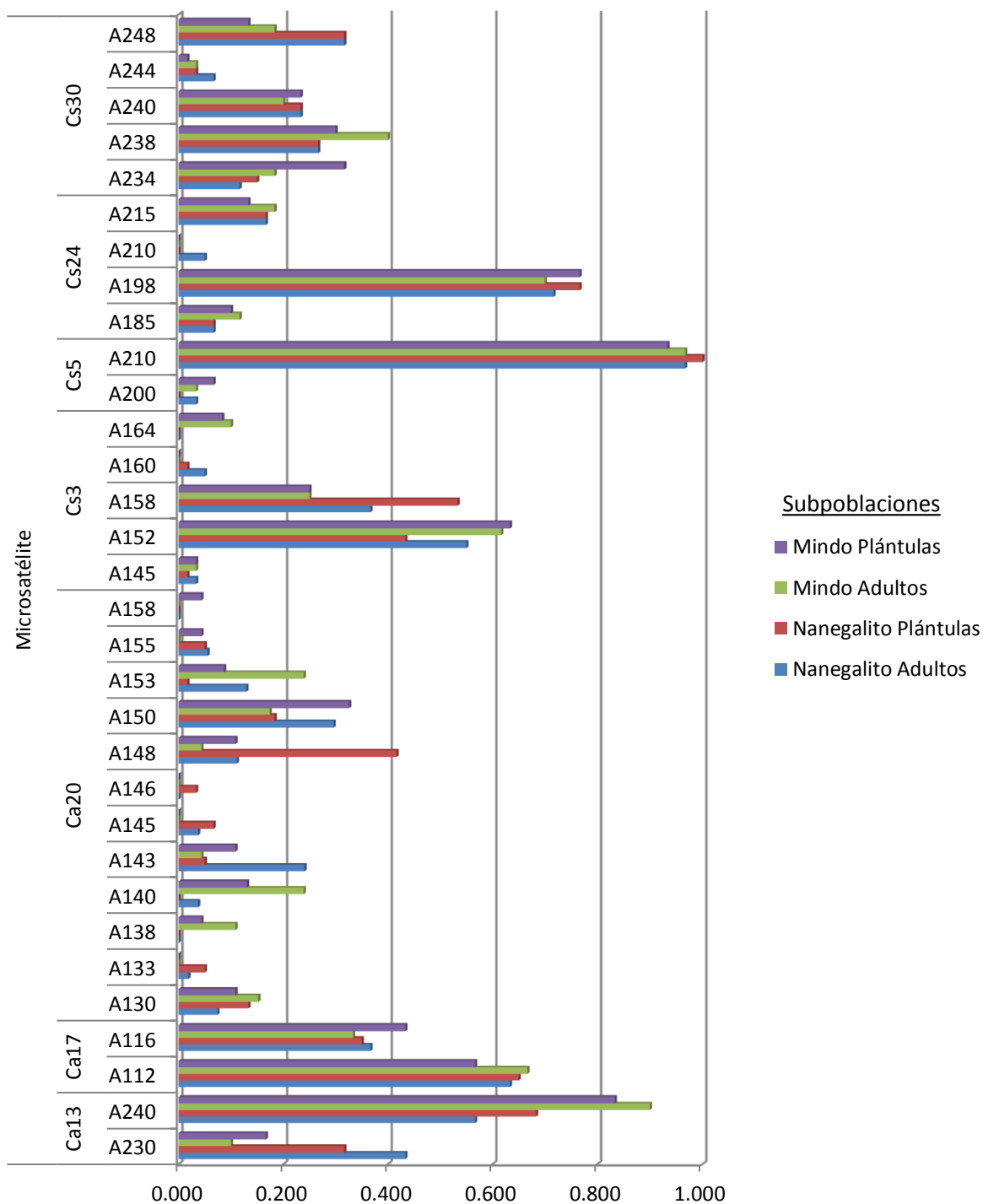


Figura 5. Frecuencias alélicas para cada subpoblación de ambas poblaciones determinado en base a datos codominantes. Cada subpoblación está representado por un color como se describe en la leyenda del lado derecho del gráfico. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006).

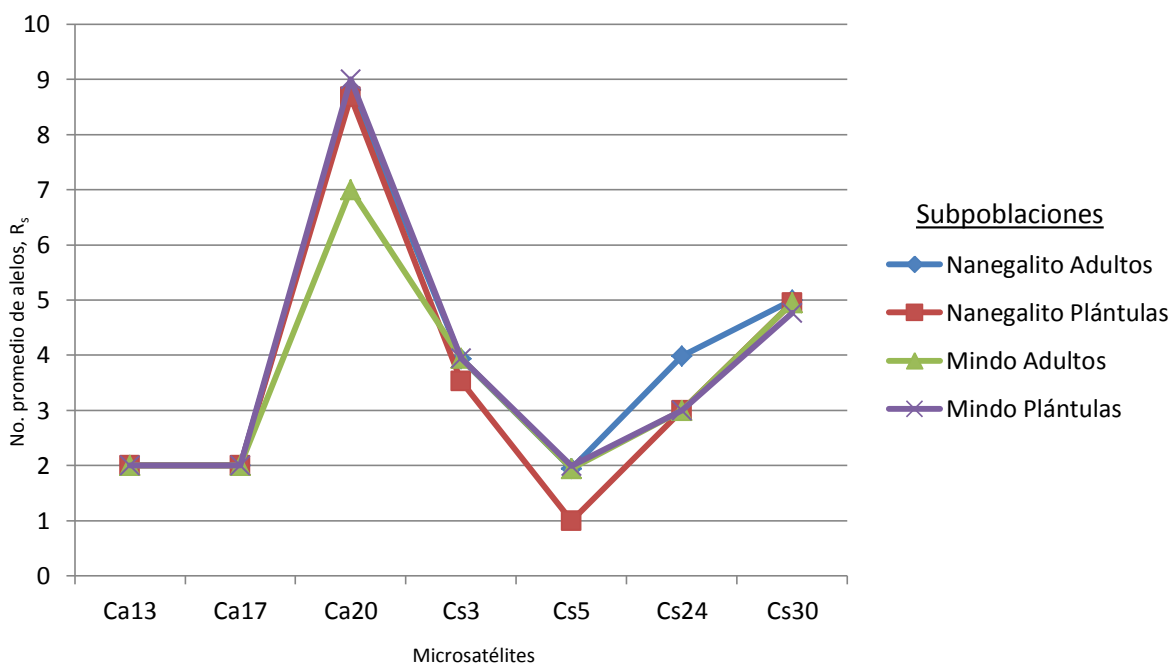


Figura 6. Variación de la riqueza alélica (número promedio de alelos) por subpoblación y microsatélite. FStat (Goudet, 2002).

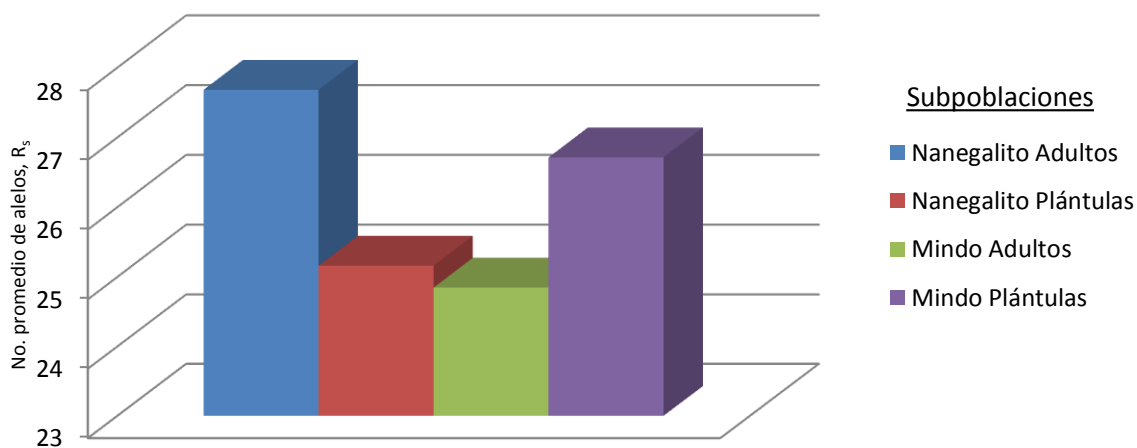


Figura 7. Variación de la riqueza alélica total para cada uno de las subpoblaciones. Cada color representa a una subpoblación como se describe en la leyenda a la derecha. El valor mínimo es 24,847 alelos (Adultos de Mindo) y el valor máximo es 27,682 alelos (Adultos de Nanegalito). FStat (Goudet, 2002).

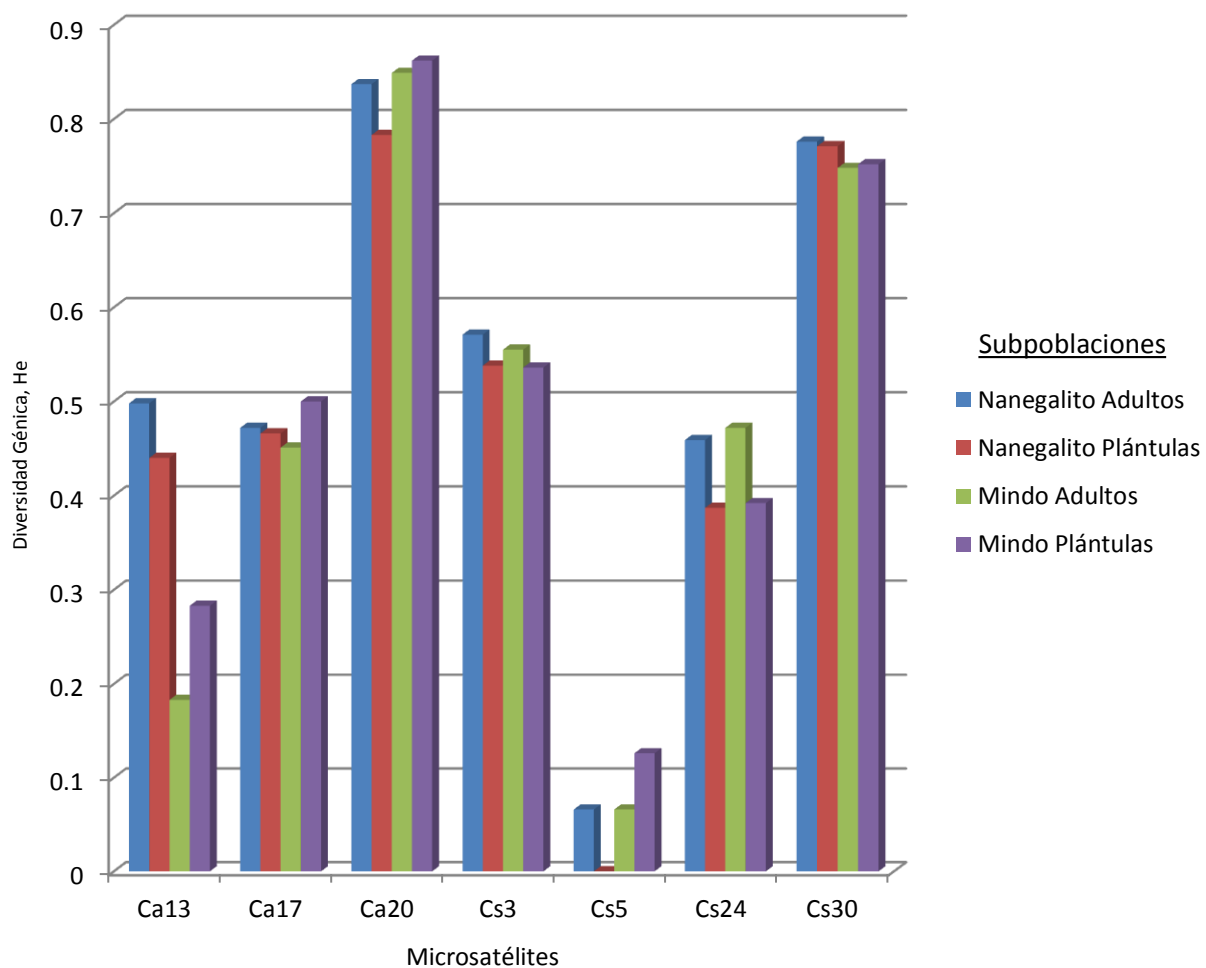


Figura 8. Diversidad génica por microsatélite y subpoblación. Los valores de las barras están dados por el índice de diversidad génica (heterocigotos esperados) calculado para cada subpoblación por cada microsatélite, obteniendo un valor que varía de 0 a 1. FStat (Goudet, 2002).

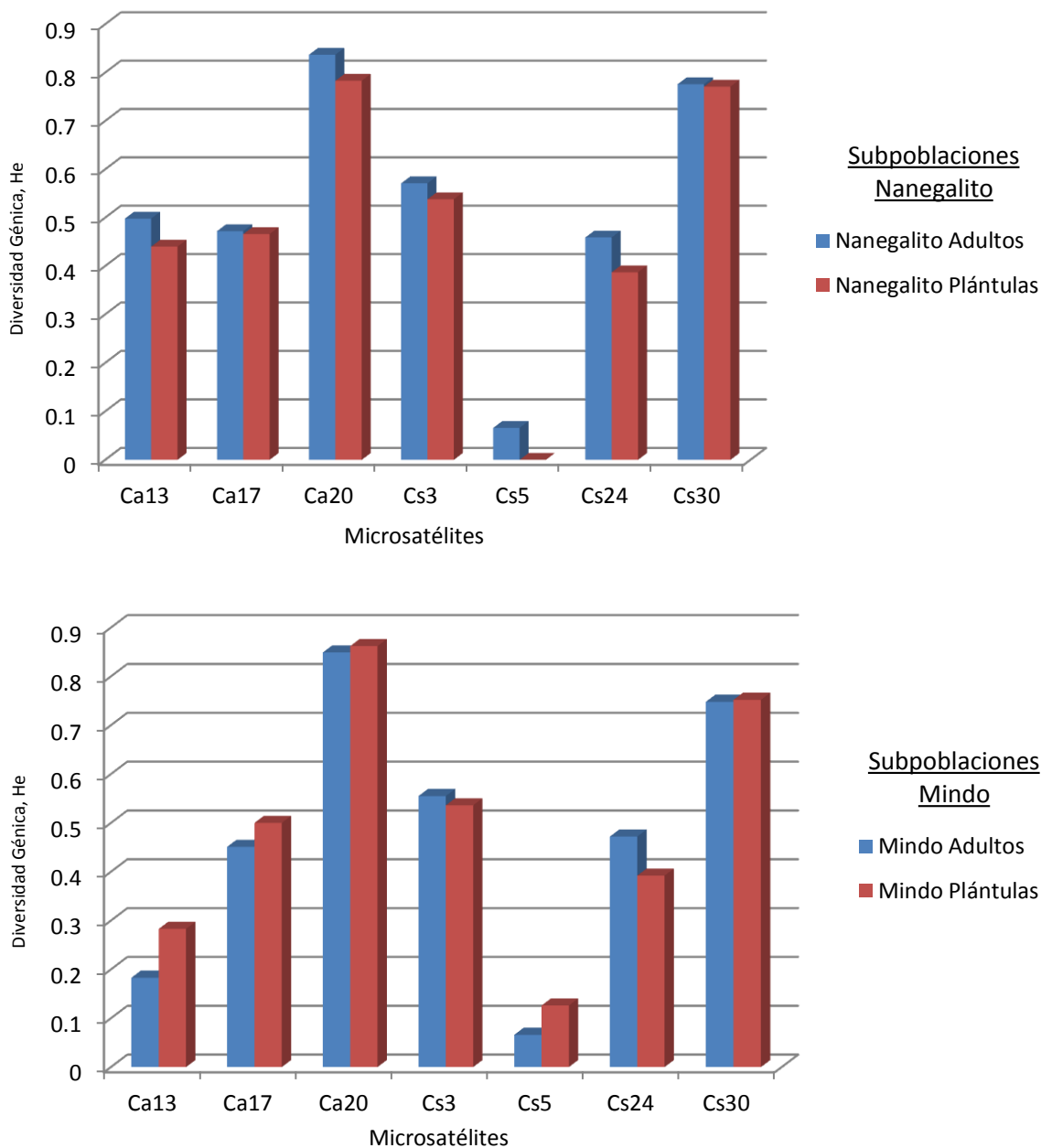


Figura 9. Diversidad génica por microsatélite y subpoblación separadas por población. En la parte superior a) la diversidad génica entre las dos subpoblaciones por cada microsatélite en la población de Nanegalito, mientras que en la parte inferior b) se muestra la misma relación para la población de Mindo. Los valores de las barras están dados por el índice de diversidad génica calculado para cada subpoblación en cada microsatélite. FStat (Goudet, 2002)

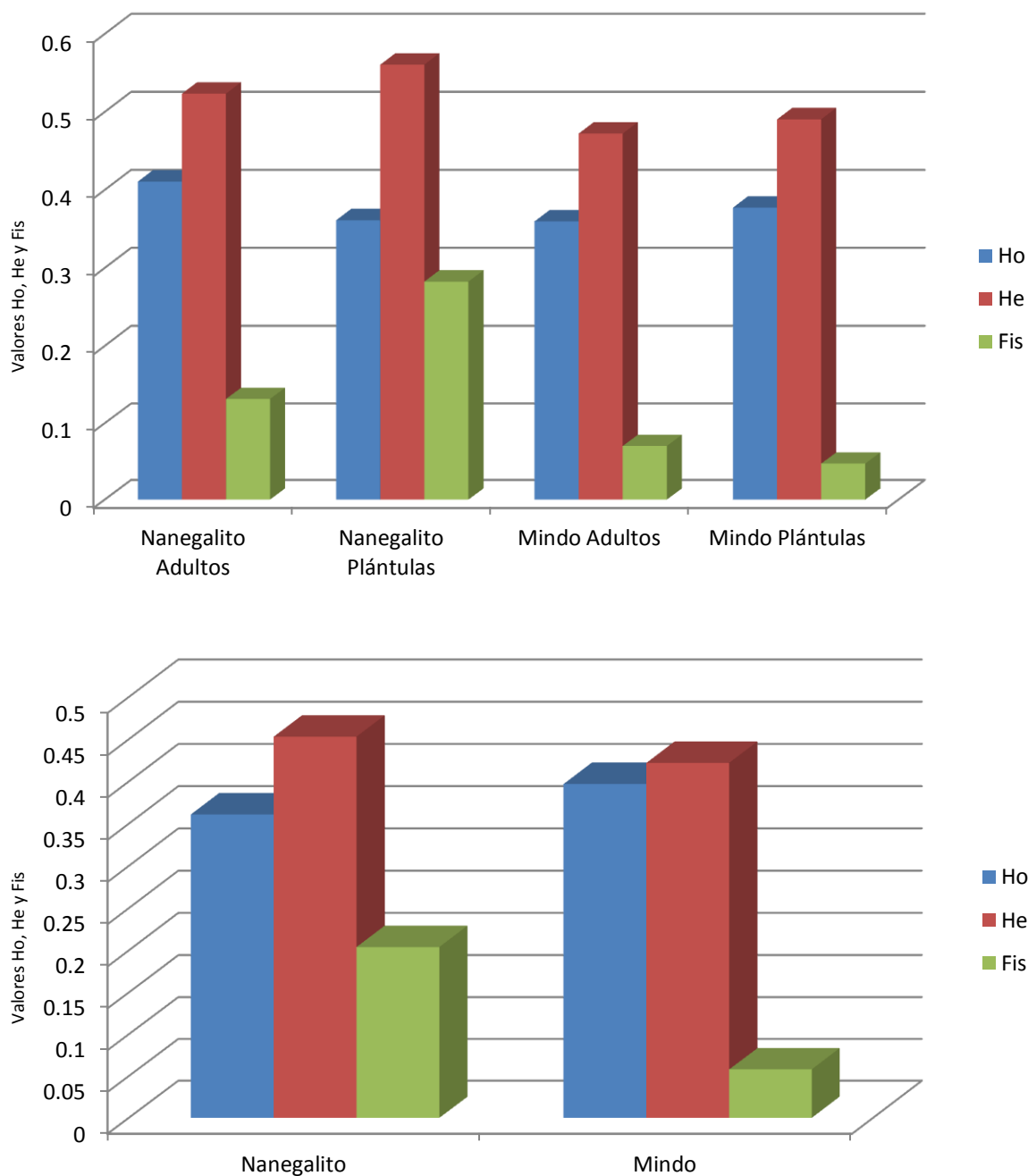


Figura 10. Relación entre heterocigotos esperados (H_e), heterocigotos observados (H_o) y coeficiente de endogamia (F_{is}) para cada población y cada subpoblación. En la parte superior se encuentra se encuentra la relación de heterocigosis y endogamia para cada subpoblación. En la sección inferior se observa la misma relación para cada población total. FStat (Goudet, 2002).

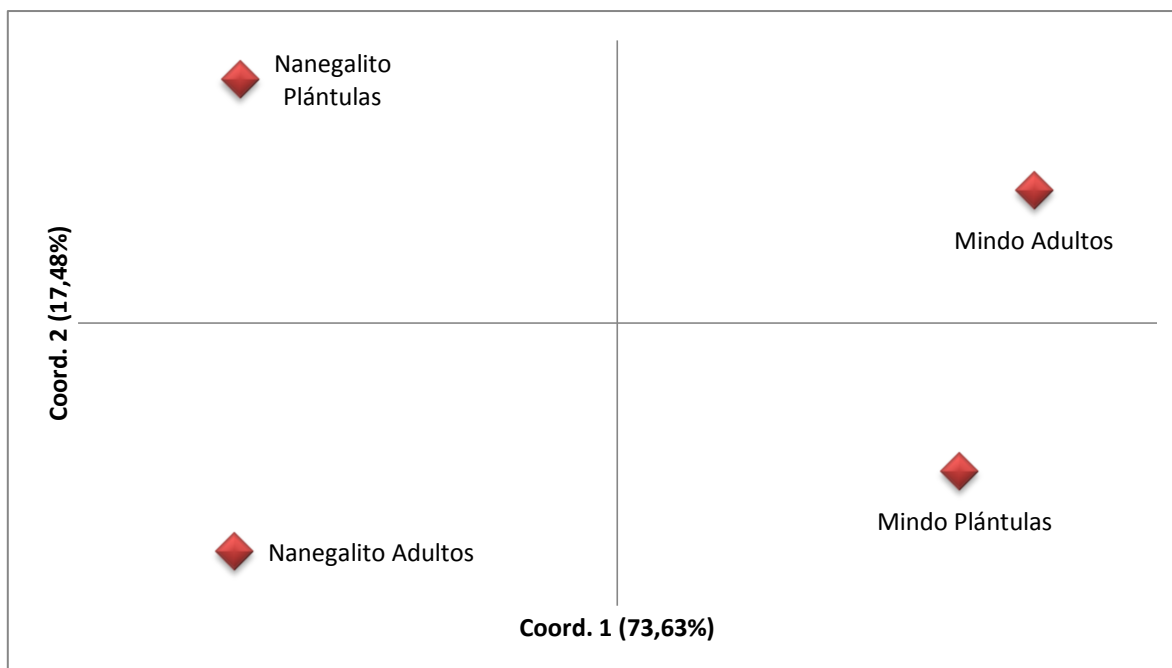


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en el índice de fijación (F_{st}) obtenido a partir de seis microsatélites (a excepción del *Ca20*). GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006).

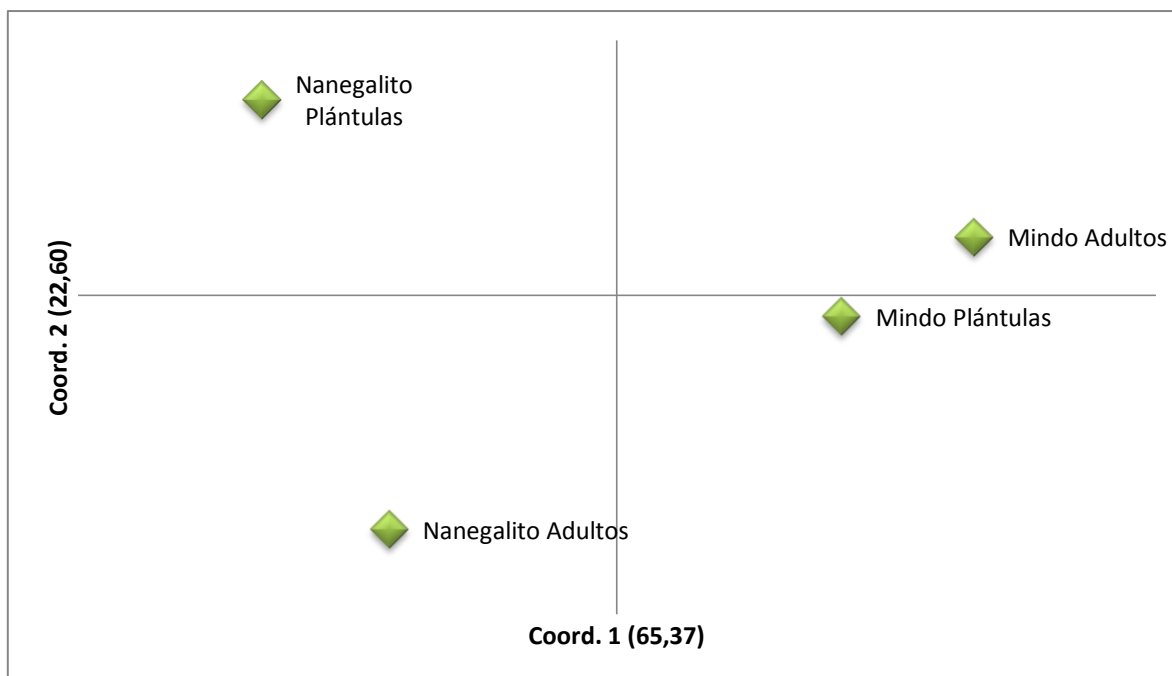


Figura 12. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la distancia genética de Nei obtenido a partir de todos los microsatélites. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006).

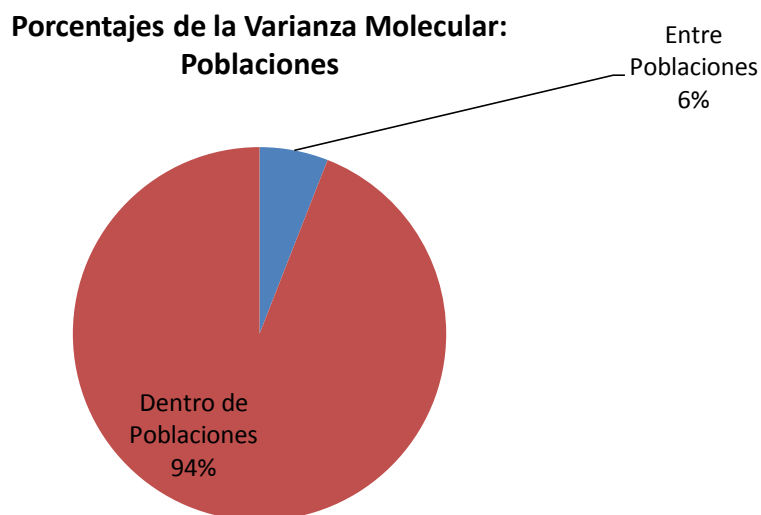


Figura 13. Porcentajes del análisis molecular de la varianza (AMOVA) entre poblaciones (Nanegalito y Mindo) obtenidos después de 9999 permutaciones. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006).

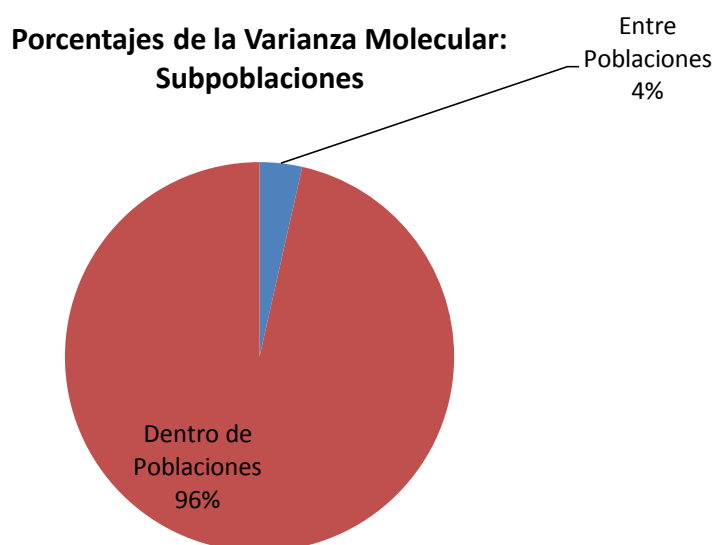


Figura 14. Porcentajes explicativos del análisis molecular de la varianza (AMOVA) entre subpoblaciones (plántulas y adultos de Nanegalito, y plántulas y adultos de Mindo) obtenidos después de 9999 permutaciones. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006).

11. TABLAS

Tabla 1. Individuos muestreados que fueron utilizados para los análisis moleculares.

Código Individuo	Estadio	Sexo	Localidad
Cae002	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae006	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae010	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae014	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae015	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae030	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae039	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae043	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae052	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae058	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae063	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae064	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae069	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae072	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae075	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae080	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae083	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae084	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae089	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae092	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae094	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae097	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae098	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae099	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae101	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae106	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae107	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae109	Adulto	Macho	Nanegalito
Cae112	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae115	Adulto	Hembra	Nanegalito
Cae003	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae007	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae012	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae017	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae021	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae025	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae031	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae035	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae041	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae053	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae060	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae062	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae065	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae074	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae076	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae078	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae081	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae085	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae087	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae090	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae091	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae095	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae096	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae100	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae102	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae105	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae108	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae110	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae113	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae114	Plántula	Indeterminado	Nanegalito
Cae213	Adulto	Hembra	Mindo
Cae214	Adulto	Macho	Mindo

Continuación...

Cae215	Adulto	Hembra	Mindo
Cae216	Adulto	Hembra	Mindo
Cae220	Adulto	Macho	Mindo
Cae221	Adulto	Macho	Mindo
Cae222	Adulto	Hembra	Mindo
Cae223	Adulto	Hembra	Mindo
Cae224	Adulto	Hembra	Mindo
Cae225	Adulto	Hembra	Mindo
Cae226	Adulto	Macho	Mindo
Cae227	Adulto	Macho	Mindo
Cae228	Adulto	Hembra	Mindo
Cae229	Adulto	Hembra	Mindo
Cae230	Adulto	Hembra	Mindo
Cae231	Adulto	Macho	Mindo
Cae234	Adulto	Hembra	Mindo
Cae235	Adulto	Macho	Mindo
Cae236	Adulto	Hembra	Mindo
Cae237	Adulto	Macho	Mindo
Cae238	Adulto	Macho	Mindo
Cae239	Adulto	Macho	Mindo
Cae240	Adulto	Hembra	Mindo
Cae241	Adulto	Macho	Mindo
Cae242	Adulto	Hembra	Mindo
Cae243	Adulto	Macho	Mindo
Cae244	Adulto	Hembra	Mindo
Cae245	Adulto	Macho	Mindo
Cae247	Adulto	Macho	Mindo
Cae248	Adulto	Hembra	Mindo
Cae158	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae159	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae160	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae161	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae162	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae163	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae164	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae165	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae166	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae167	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae168	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae169	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae170	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae171	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae172	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae173	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae174	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae175	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae176	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae177	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae178	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae179	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae181	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae182	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae183	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae184	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae185	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae186	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae187	Plántula	Indeterminado	Mindo
Cae188	Plántula	Indeterminado	Mindo

Tabla 2. Resultados de las pruebas de amplificación cruzada con secuencias de microsatélites descritos para géneros cercanos a *Ceroxylon echinulatum*.

Microsatélite	Amplificación	Polimorfismo	Aislado de	Referencia
A105A	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A105C	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A125B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A2(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A5(5a)	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A5(5c)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
A65C	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
AG5-5#1	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
AG5-7#7	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
AG5-7#9	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
B11(5b)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
B35C	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
B75B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
B95B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
C1(5b)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
C25B	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
C75A	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
CAC50-T2#2	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
D2(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
D35B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
D5(5c)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
D6(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
D65A	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
E35A	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
E35C	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
E5(5c)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
EE15	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
EE3	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
F105B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
F2(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
F25A	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
F65B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
G1(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
G105B	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
G6(5a)	+	M	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
G9(5b)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
H125C	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
H2(5a)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
H7(5b)	-	NA	<i>Oenocarpus bataua</i>	Montúfar <i>et al.</i> , 2006
BgCIR10	-	NA	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR41	+	M	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR57	-	NA	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR58	-	NA	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR71	+	M	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR77	-	NA	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR87	+	M	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR91	-	NA	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
BgCIR94	+	M	<i>Bactris gasipaes</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004a
PdCIR10	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR15	+	M	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR16	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR25	+	M	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR35	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR44	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR50	+	M	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR57	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR63	+	M	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR70	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR78	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR85	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b
PdCIR90	-	NA	<i>Phoenix dactylifera</i>	Billote <i>et al.</i> , 2004b

M: Monomórfico, NA: No Amplifica

Tabla 3. Protocolo PCR descrito por Gaitán (2003) para la amplificación de microsatélites nucleares de *Ceroxylon echinulatum*.

<u>Concentración del coctel de reacción en 15ul de solución</u>		
<u>Reactivo</u>	<u>Concentración</u>	
Buffer de Reacción (-Mg)	1x	
Cloruro de Magnesio	2,5mM	
dNTP's Mix	0,25mM	
Primers	0,1uM de cada uno (F y R)	
Taq Polimerasa	1 unidad	
<u>Programa PCR</u>		
<u>Evento</u>	<u>Temperatura</u>	<u>Tiempo</u>
Denaturación Inicial	94°C	4min
Denaturación (35 ciclos)	94°C	15sec
Anillamiento (35 ciclos)	50 / 52°C	15sec
Elongación (35 ciclos)	72°C	15sec
Elongación Final	72°C	5min

Tabla 4. Prueba de transferibilidad de microsatélites descritos para *Ceroxylon sasaimae* y *Ceroxylon alpinum* subsp. *alpinum* (Gaitán, 2003) hacia *Ceroxylon echinulatum*.

Locus	Motivo Repetido	Tamaño del Fragmento (bp)	Amplificación
Ca1	(GA) ₁₇ (GA) ₅	242	Monomórfico
Ca5	(CA) ₁₁	105	Monomórfico
Ca6	(CA) ₁₉	115	Monomórfico
Ca7	(CT) ₁₅ (CA) ₁₇	110	Monomórfico
Ca11	(CT) ₁₀ (GT) ₈	140	Monomórfico
Ca13	(GA) ₂₂	230 – 240	Polimórfico
Ca16	(TC) ₁₁ (CA) ₈	162	Monomórfico
Ca17	(GA) ₃₀	112 – 116	Polimórfico
Ca20	(GA) ₂₀ (GA) ₂₉	130 – 158	Polimórfico
Ca23	(AG) ₁₀	150	Monomórfico
Ca25	(GA) ₁₅	128	Monomórfico
Ca30	(GT) ₁₀ (GT) ₁₄	120	Monomórfico
Cs2	(GA) ₂₄	230	Monomórfico
Cs3	(AC) ₁₃ (GA) ₃₂	145 – 164	Polimórfico
Cs5	(TG) ₆ (GT) ₄	200 – 210	Polimórfico
Cs9	(GA) ₉ (TAA) ₃		No Amplificó
Cs15	(GT) ₈ N(GT) ₅ (TGG) ₄	145	Monomórfico
Cs19	(CA) ₁₁	103	Monomórfico
Cs24	(CA) ₂₀ (GA) ₅	185 – 215	Polimórfico
Cs30	(GA) ₁₅	234 – 248	Polimórfico
Cs34	(CA) ₁₄	170	Monomórfico

Las pruebas PCR fueron hechas tomando 60 muestras entre plántulas y adultos y entre diferentes poblaciones (incluyendo otras poblaciones que no se encuentran dentro de esta investigación), una vez amplificadas las muestras se las corrieron en un gel de poliacrilamida para observar si existen diferencias alélicas (polimorfismo).

Tabla 5. Valores de probabilidad obtenidos para el desequilibrio ligado (linkage disequilibrium) para cada par de microsatélites de los siete usados para esta investigación. FStat (Goudet, 2002).

Locus	Ca13	Ca17	Ca20	Cs3	Cs5	Cs24	Cs30
Ca13	*						
Ca17	0,89476	*					
Ca20	0,49905	0,69143	*				
Cs3	0,73667	0,41190	0,46238	*			
Cs5	0,50286	0,91381	0,22095	0,85905	*		
Cs24	0,50190	0,01667	0,94810	0,26048	0,76857	*	
Cs30	0,37810	0,58952	0,83190	0,58810	0,56429	0,04000	*

Valores ajustados de P 5% < 0,002381 y 1% < 0,000476 basados en 2100 permutaciones.

Tabla 6. Número de alelos totales por población y por microsatélite. FStat (Goudet, 2002).

Microsatélite (Locus)	Nanegalito (n=60)	Mindo (n=60)	Total (n=120)
Ca13	2	2	2
Ca17	2	2	2
Ca20	10	9	12
Cs3	4	4	5
Cs5	2	2	2
Cs24	4	3	4
Cs30	5	5	5
Total	29	27	

Tabla 7. Número de alelos para cada subpoblación por cada microsatélite. FStat (Goudet, 2002).

Microsatélite (Locus)	Nanegalito	Nanegalito	Mindo	Mindo	Total (n=120)
	Adultos (n=30)	Plántulas (n=30)	Adultos (n=30)	Plántulas (n=30)	
Ca13	2	2	2	2	2
Ca17	2	2	2	2	2
Ca20	9	9	7	9	12
Cs3	4	4	4	4	5
Cs5	2	1	2	2	2
Cs24	4	3	3	3	4
Cs30	5	5	5	5	5
Total Subpoblación	28	26	25	27	

Tabla 8. Riqueza alélica por locus, subpoblación y población basado en el número promedio de alelos. FStat (Goudet, 2002).

Microsatélite (Locus)	Nanegalito		Mindo		Total Locus
	Adultos	Plántulas	Adultos	Plántulas	
Ca13	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Ca17	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000
Ca20	8,810	8,681	7,000	9,000	9,915
Cs3	3,938	3,533	3,949	3,948	4,264
Cs5	1,949	1,000	1,949	1,998	1,823
Cs24	3,987	2,998	3,000	3,000	3,464
Cs30	4,998	4,949	4,949	4,767	4,858
Total Subpoblación	27,682	25,161	24,847	26,713	

Tabla 9. Relación y diferenciación genética entre todas las subpoblaciones basado en el índice de fijación (F_{st} , rojo) y la distancia genética de Nei (verde). Arlequin 3.11 (Excoffier, 2007).

<u>Subpoblaciones</u>	Nanegalito Adultos	Nanegalito Plántulas	Mindo Adultos	Mindo Plántulas
Nanegalito Adultos	*	0,009	0,029	0,023
Nanegalito Plántulas	0,011	*	0,027	0,025
Mindo Adultos	0,044	0,038	*	0,007
Mindo Plántulas	0,04	0,038	0,010	*

Para el índice de fijación los valores de 0 – 0,05 existe poca diferenciación, en valores de 0,05 – 0,25 existe una diferenciación moderada y en valores > 0,25 hay una diferenciación genética total (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Para la distancia genética de Nei los valores varían de 0 a infinito, siendo 0 el valor donde las poblaciones son iguales (Nei, 1972).

Tabla 10. Resultados del AMOVA de dos vías comparando diferentes variables entre las subpoblaciones estudiadas. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006)

	Nanegalito Adultos (n=30)	Nanegalito Plántulas (n=30)	Mindo Adultos (n=30)	Mindo Plántulas (n=30)	Valor de Referencia P 5%
Riqueza Alélica (R_s)	3 ^{NS}	2,5 ^{NS}	2,833 ^{NS}	2,917 ^{NS}	<0,094
Heterocigotos Esperados (H_e)	0,475 ^{NS}	0,433 ^{NS}	0,408 ^{NS}	0,434 ^{NS}	<0,131
Heterocigotos Observados (H_o)	0,411 ^{NS}	0,311*	0,383 ^{NS}	0,411 ^{NS}	<0,331
F_{is}	0,135 ^{NS}	0,282*	0,06 ^{NS}	0,052 ^{NS}	>0,178
F_{st}	-0,008 ^{NS}	0,002 ^{NS}	0,02 ^{NS}	-0,01 ^{NS}	>0,836
Distancia Genética de Nei	-0,014 ^{NS}	0,003 ^{NS}	0,037 ^{NS}	-0,018 ^{NS}	>0,821

Valores de p al 5% obtenidos después de 9999 permutaciones.

Tabla 11. Resultados del AMOVA de dos vías comparando diferentes variables entre la población de Nanegalito y Mindo. GenAlEx (Peakall y Smouse, 2006)

	Nanegalito (n=60)	Mindo (n=60)	Valor de Referencia P 5%
Riqueza Alélica (R_s)	3 ^{NS}	3 ^{NS}	<1
Heterocigotos Esperados (H_e)	0,453 ^{NS}	0,422 ^{NS}	<0,353
F_{is}	0,204 ^{NS}	0,058 ^{NS}	>0,353
F_{st}	-0,005 ^{NS}	-0,004 ^{NS}	>0,6745
Distancia Genética de Nei	-0,009 ^{NS}	-0,007 ^{NS}	>0,6745

Valores de p al 5% obtenidos después de 9999 permutaciones.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Muestras colectadas en el campo



a) Muestra de plántula al ser colectada.



b) Raíces adventicias de un individuo adulto

ANEXO 2. Protocolo de extracción de ADN vegetal mediante el kit comercial

PureLink™ Plant Total DNA Purification Kit de Invitrogen.

Para iniciar se añadió 250ul del buffer de resuspensión (R2) junto al material que se iba a macerar, sean los fragmentos de raíz u hoja, dentro del mortero y con la ayuda del pistilo se homogeneizó el material obteniendo una solución que fue recuperada en un tubo eppendorf.

Luego, a la solución se le añadió 15ul de SDS al 20% y 15ul de RNAsa A (20mg/ml), y se mezcló la muestra mediante un vortex para homogeneizar todos los reactivos en la solución. Seguidamente, la solución se incubó a 55°C durante 15min para facilitar la lisis celular y digerir el ARN presente en la solución.

La solución incubada fue centrifugada a máxima velocidad durante 5min para separar los compuestos más densos, para luego recuperar la parte superficial del centrifugado y ponerlo en un nuevo tubo eppendorf. Al sobrenadante recuperado se le añadió 100ul del buffer de precipitación (N2) el cual condensaba a las proteínas para separarlas de la solución. La solución con el buffer N2 fue incubada en hielo durante 5min con el objeto de facilitar la condensación de las proteínas. Luego las proteínas fueron separadas de la solución por centrifugación a máxima velocidad durante 5min luego de la incubación.

Una vez más, recuperado el sobrenadante de la solución, se lo transfirió a un nuevo tubo y la nueva solución (aproximadamente 250ul) fue mezclada con 375ul de binding buffer (B4) que posee alcohol. Luego esta nueva solución se la transfirió a la columna de lavado proporcionada por el kit. El buffer B4 interactúa con el ADN y hace que se una a la membrana

de la columna, este paso se lo hizo mediante una centrifugación corta (15sec) y suave (8500rpm) para que la solución pase por la membrana y el ADN quede pegado a esta.

Luego la columna con la membrana se la pasó a otra base para realizar lavados al ADN y eliminar cualquier otra molécula o inhibidor que se encuentre asociada a esta. A la membrana de la columna se le añadió 500ul de wash buffer (W4) y luego se centrifugó la columna a 8500rpm por 30sec, se descartó el buffer pasado por la membrana. A continuación, se añadió 500ul de wash buffer (W5) en la membrana y se la centrifugó bajo los mismos parámetros anteriores, y una vez más se repitió este último paso. Finalmente, sin ningún reactivo sobre la membrana se procedió a secar de cualquier residuo mediante un centrifugado a máxima velocidad durante dos minutos.

Por último, a la columna con la membrana se la puso en un tubo eppendorf y sobre la membrana se puso 100ul de buffer de elusión (E1) y se lo dejó incubar a temperatura ambiente durante 1min; después se la centrifugó a máxima velocidad durante 1min obteniendo de esta manera la solución A de ADN. Se repitió una vez más este último paso para obtener la solución B.

ANEXO 3. Preparación de geles de agarosa

Para la fabricación de un gel de agarosa se procedió a pesar 0,9g (gel al 1%) o 1,35g (gel al 1,5%) y se disolvió en 90ml de una solución de TBE 1X, mediante calor. Una vez obtenida la solución totalmente líquida, se la dejó enfriar hasta unos 55°C y se le añadió 5ul de bromuro de etidio; luego esta solución se puso sobre el molde de la cámara de electroforesis y se la dejó reposar hasta que se polimerize. Por último se colocó el gel en la cámara y se le añadió TBE 1X hasta cubrirlo totalmente, y se puso 14ul de bromuro de etidio en la cámara.

ANEXO 4. Preparación y revelado de geles de poliacrilamida al 6% basado en el protocolo del kit secuenciamiento de Promega.

Para la elaboración de geles de poliacrilamida al 6% el primer paso a realizarse es el tratamiento de los vidrios, tanto repulsivo como atrayente.

Para el vidrio repulsivo, este debe estar totalmente limpio y una vez seco se hacen lavados en la cara tratada mediante papel absorbente y alcohol al 95%, haciendo movimientos horizontales y luego verticales. Una vez limpio y seco el vidrio, se procede a tratarlo con una solución de 750ml de alcohol al 95% siliconizado, de igual manera con papel absorbente y movimientos verticales y horizontales. Se deja reposar al vidrio con el tratamiento durante unos 5 a 10min y luego se seca el exceso con papel absorbente siguiendo los mismos movimientos.

Por otro lado, para el vidrio atrayente, una vez hecha la misma limpieza descrita para el vidrio repelente, se lo trata con una solución de 1ml de alcohol al 95% mezclada con 3ul de bind xilano y 5ul de ácido glacial acético esparciéndola bien mediante un papel absorbente y movimientos verticales y horizontales. Luego se deja reposar al vidrio de 5 a 10min y se retira el exceso del tratamiento.

Una vez tratados los vidrios, se ponen los espaciadores limpios sobre uno de los vidrios y se los acomoda de tal manera aíslen los tres márgenes basales del vidrio, de esta manera se coloca el otro vidrio encima con las caras tratadas hacia adentro y se aseguran con pinzas a lo

largo de los márgenes de los vidrios, dejándolos listos para colocar la solución de poliacrilamida en medio de ambos vidrios.

Para preparar la solución de poliacrilamida al 6%, se procedió a mezclar en un vaso (250ml), 24g de urea (5M) y 16ml de una solución de TBE 10X. Esta solución fue disuelta mediante incubación a 50°C, de esta manera, obteniendo la solución totalmente líquida se le añadió 12ml de acrilamida:bisacrilamida al 40% y a esta solución se la aforó con agua miliQ a 80ml y se la mezcló bien. Finalmente, se le añadió los catalizadores para producir la polimerización, siendo estos 50ul TEMED y 500ul de solución Persulfato al 10% (0,1g de Persulfato y 1ml de agua miliQ).

La solución lista de acrilamida se vertió en medio de los 2 vidrios previamente tratados y armados, tratando de evitar que se generen burbujas o espacios vacíos. Con los vidrios llenos se procedió a cerrar el único acceso (por donde se vertió la solución de poliacrilamida) con ayuda del peine que va a ser utilizado para crear los pocillos. De esta manera, se deja polimerizar la poliacrilamida en los vidrios durante una noche.

A continuación, el gel completamente polimerizado y listo se lo prepara para montarlo en la cámara de electroforesis. Primero se sueltan las pizas y se limpian los vidrios de cualquier residuo extra de poliacrilamida que quede (especialmente en el sitio de carga). Luego, se limpia con cuidado el frente de migración y se coloca el peine para crear los pocillos donde se van a cargar las muestras. Seguidamente se coloca el gel en la cámara, la cual está previamente llena de TBE 1X para cerrar el circuito por medio del gel y se lo precalienta haciendo que corra en el programa propuesto durante 30min.

Luego de terminada la migración en el gel, la cámara es desarmada y los vidrios son separados, para esto en el vidrio repelente no debe pegarse nada del gel mientras que en el atrayente debe quedar el gel en forma de una película lisa. Al obtener estas condiciones se procede a revelar el gel.

El revelado del gel comprende de 4 etapas, las cuales son fijación, tinción, revelado e interrupción de la reacción.

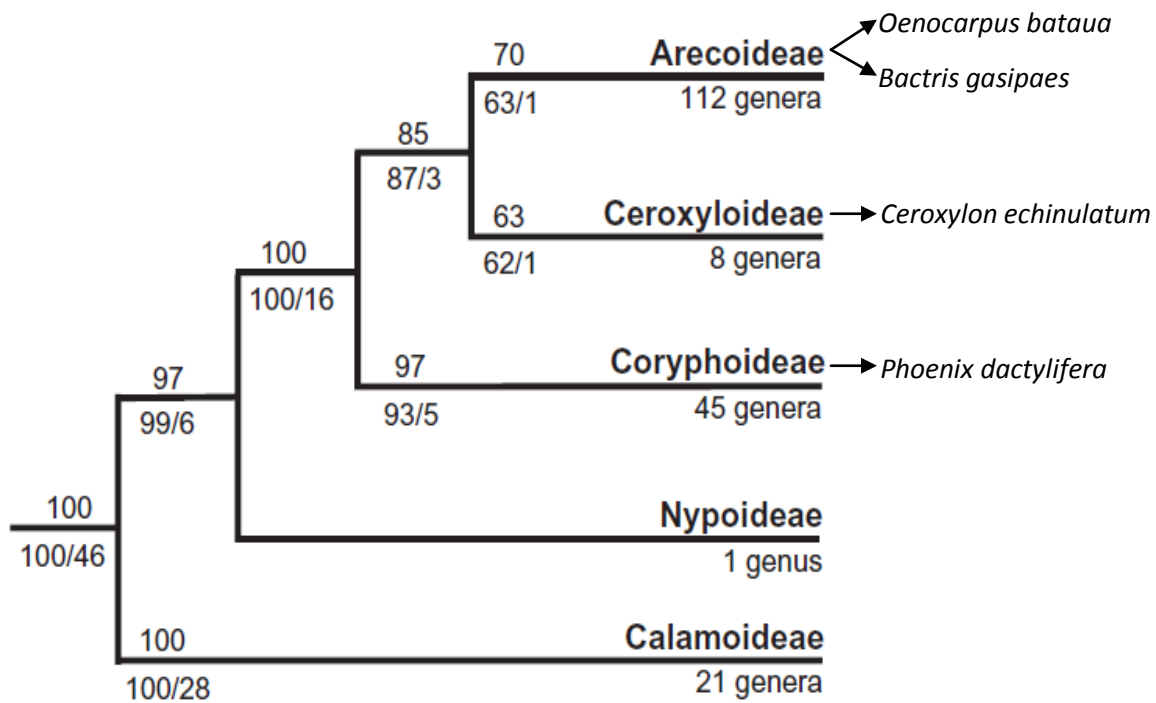
Fijación: El gel junto al vidrio en el que se encuentra pegado se lo trata con una solución ácido glacial acético al 10%. El gel tiene que quedar completamente sumergido en la solución para garantizar que las muestras se queden fijadas y no se difuminen dentro del gel, para esto la solución se hace en 1 litro (900ml de agua miliQ y 100ml de ácido glacial acético). En esta solución se deja al gel durante 20min y después se lo retira para realizar tres lavados (2min cada uno) con un litro de agua miliQ, con el objeto de retirar cualquier residuo de Ac. Acético del gel y proceder con la tinción. Se recupera la solución utilizada de ácido acético para usarla en la interrupción de la reacción al final.

Tinción: Se elabora la solución para tinción la cual está conformada de nitrato de plata y formaldehído, de esta manera, en un litro de agua se disuelve 1g de nitrato de plata y se adiciona 1,5ml de formaldehído. El gel es sumergido en esta solución durante 30min a movimiento constante para garantizar la tinción de todo el gel. Luego se extrae el gel de la solución y se lo enjuaga suavemente y poco tiempo con agua miliQ para quitar el exceso de nitrato de plata.

Revelado: Hasta este punto el gel sigue transparente por esta razón para evidenciar las bandas o la información del gel, se necesita revelar el gel reduciendo la plata que se encuentra en asociado al ADN. Para elaborar la solución que permite revelar al gel, se disuelven 60g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en 2 litros de agua y se adiciona 3ml de formaldehído y 600ul de tiosulfato de sodio. El gel primero es sumergido en un litro de de la solución con constante movimiento, cuando se empiezan a ver las primeras bandas se cambia la solución con el litro restante de la solución y se sigue tiñendo hasta que las bandas sean completamente claras.

Interrupción de la reacción: Con la solución de ácido acético recuperada del primer paso, se sumerge el gel para cambiar abruptamente el pH y detener la reacción, puesto que si la reacción no se detiene esta continuará hasta teñir todo el gel dejándolo totalmente negro y sin bandas aparentes.

ANEXO 5. Relación filogenética de *Bactris*, *Oenocarpus* y *Phoenix* con respecto a *Ceroxylon* a nivel de subfamilias dentro de Arecaceae.



Asmussen *et al.*, 2006

13. GLOSARIO

Alelo: Forma particular de un gen o locus dado.

Alelo Nulo: Es un alelo que no se puede amplificar bajo las condiciones estándar de PCR para ese locus en particular, debido a la existencia de una alteración o mutación en la secuencia complementaria del cebador o primer.

Desequilibrio Ligado (Linkage Disequilibrium): Es la probabilidad de que dos o más alelos de loci distintos se encuentren juntos y por lo tanto se segreguen juntos durante la meiosis, es decir que estos estén ligados y no tengan independencia en la segregación.

Depresión Endogámica: Reducción de la aptitud biológica de la descendencia debido a reproducción entre individuos cercanamente relacionados.

Dinámica Poblacional: Cambios biológicos o ambientales que influyen el tamaño y composición de una población.

Distancia Genética: Es la relación genética que existe entre dos o más grupos de individuos o poblaciones.

Diversidad Genética: Es la cantidad de variaciones que se encuentra dentro de un grupo o una población, y estas variaciones son determinadas por varios cálculos basados en diferentes parámetros.

Diversidad Génica: Cálculo que determina la variabilidad de un grupo o población (diversidad genética) basado en la probabilidad de que dos alelos tomados al azar sean diferentes dentro de la población, lo que es equivalente al cálculo para obtener heterocigotos esperados bajo el modelo de Hardy – Weingberg..

Endogamia: Reproducción entre individuos emparentados. Estadísticamente, la endogamia es la probabilidad de que un individuo tenga dos copias del mismo alelo en un locus particular.

Equilibrio Hardy – Weinberg: Modelo basado en una población donde los individuos se reproduzcan sexualmente y al azar (sin selección) y de esta manera las proporciones dentro de la población se puedan predecir en base a la ecuación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Estadísticos – *F*: Son un conjunto de cálculos que permiten estimar la estructuración o diferenciación entre individuos y entre grupos de individuos.

Estructura Genética: Son las múltiples variaciones genéticas o moleculares presentes en una población o grupo determinado.

Locus (Loci, plural): Zona o región particular dentro de un genoma o de una secuencia de ADN.

Microsatélite: Es una porción de ADN que se encuentra repetida varias veces en secuencias pequeñas denominadas secuencias tandem. Son usados como marcadores moleculares, ya que

al ser secuencias repetitivas mutan fácilmente dentro del genoma incrementando su polimorfismo en una población.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Técnica que permite obtener varias copias (amplificación) de un fragmento particular de ADN, mediante primers o cebadores específicos y una enzima polimerasa termoestable.

Primers: Conocidos también como cebadores, son pequeñas secuencias de ADN o ARN (Oligonucleotidos), que si son específicas, son diseñadas para ser complementarias a los flanqueantes de un locus particular y promover la replicación de esa zona (amplificación).

Riqueza Alélica: Es un estimador de la diversidad genética, el cual está basado en el número promedio de alelos para un locus en particular dentro de una población.

Slippage: Es un error de la TaqPolimerasa durante la elongación en un PCR, donde se sintetizan nucleótidos extras al final de una secuencia repetitiva.