

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TITULO DE LA DISERTACIÓN

“Diversidad Genética de *Phytelephas aequatorialis* Spruce en la provincia de Manabí”

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

DAVID ANDRES VERGARA PACHECO

Quito, 2015

CARTA DE TERMINACIÓN DE LA DISERTACIÓN

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del candidato David Andrés Vergara Pacheco ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la revisión y calificación correspondiente.

Rommel Montúfar G.

Dr. Rommel Montúfar Galárraga

Fecha: 9 de diciembre 2014.

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres

A mi hermano y a mi hermana

Al amor de mi vida

Gracias a Dios porque siempre que me acerco a él cosas muy buenas suceden en mi vida, por ayudarme a crecer día a día, por enseñarme el camino.

Gracias a mis padres porque ellos han estado siempre apoyándome desde que nací en todas las cosas que quiero lograr y cumplir

Gracias a mi hermana y a mi hermano por ser siempre una guía y un ejemplo de superación personal, ejemplo de que los sueños se pueden cumplir si crees en ellos

Gracias al amor de mi vida Mile porque has cambiado todo mi mundo, por siempre presionarme a seguir avanzando, gracias por ser mi motivo y ser la fuerza para querer siempre ser mejor, juntos lo podemos todo te amo.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente al Dr. Rommel por ser ejemplo, por siempre impulsarme y guiarme en todo este proceso. Quiero agradecer a Ana Troya quien fue la persona que me enseñó y me ayudó en todo el trabajo de laboratorio. Quiero agradecer a Sebastián Escobar, a Andrea Pinos, Andrés Recalde, Gabriel Rivadeneira por darme su apoyo para poder avanzar en los resultados.

Quiero agradecer al Laboratorio 113, un lugar lleno de ciencia por descubrir. A la PUCE, a todos mis amigos principalmente al Alejo Saa, David Belalcazar y Diego Ortiz que con alegría y positivismo nos impulsamos todos a concluir esta carrera.

Quiero agradecer a mi madre por siempre estar a mi lado apoyándome. A mi novia por brindarme apoyo en la escritura de la tesis.

INDICE DE CONTENIDOS

CARTA DE TERMINO DE LA DISERTACIÓN.....	III
DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
INDICE DE CONTENIDOS.....	VI
INDICE DE FIGURAS.....	X
INDICE DE TABLAS.....	XI
INDICE DE ANEXOS.....	XII
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Inflorescencia y su relación con polinizadores.....	5
3.2. Exogamia.....	7
3.3. Efecto antropogénico sobre la estructura genética.....	8
3.4. Importancia de la diversidad genética en las localidades.....	11
3.5. Especie de estudio: <i>Phytelephas aequatorialis</i> Spruce.....	11
3.5.1. Distribución y taxonomía.....	11
3.5.2. Características Morfológicas.....	12
3.5.3. Biología y ecología.....	13

3.5.4. Polinización de <i>Phytelephas</i>	14
3.5.5. Productividad de <i>Phytelephas aequatorialis</i> para la obtención de tagua.....	16
3.6. Marcadores Moleculares.....	20
3.6.1. Microsatélites como marcador molecular.....	20
3.6.2. Estudios Moleculares previos en <i>Phytelephas aequatorialis</i>	21
4. OBJETIVOS.....	22
4.1. Objetivo General.....	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
5.1. Obtención de muestras.....	23
5.2. Identificación y colección de muestras.....	23
5.3. Determinación de sitios de colección.....	24
5.4. Obtención de microsatélites como marcadores moleculares.....	24
5.5. Pruebas de transferibilidad.....	25
5.6. Extracción de ADN.....	25
5.7. Estandarización de protocolos PCR.....	25
5.8. Visualización en geles y obtención de datos.....	26
5.9. Medición y tabulación de datos.....	27

5.10. Análisis estadísticos.....	27
5.10.1. Análisis de Desequilibrio ligado.....	28
5.10.2. Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg.....	28
5.10.3. Análisis de Diversidad Genética.....	30
5.10.4. Análisis de Diferenciación Genética.....	31
5.10.5. Análisis de Aislamiento por Distancia.....	34
5.10.6. Análisis de Variancia Molecular (AMOVA).....	34
6. RESULTADOS.....	35
6.1. Obtención de ADN.....	35
6.2. Análisis Estadísticos.....	35
6.2.1. Datos de Desequilibrio Ligado y Equilibrio Hardy-Weinberg.....	35
6.2.2. Datos de Diversidad Genética.....	36
6.2.3. Datos de Diferenciación y Variación Genética.....	37
6.2.4. Datos de Auto correlación Espacial.....	37
7. DISCUSIÓN.....	38
7.1. Selección de heterocigotos en localidades de <i>P. aequatorialis</i> por influencia de polinizadores.....	38
7.2. Selección de heterocigotos.....	39
7.3. Reclutamiento de nuevos individuos.....	42

7.4. Vegetación amenazada.....	43
7.5. Impacto de la degradación de los bosques en la fauna local.....	44
7.6. Implicaciones para el manejo y conservación.....	45
8. LITERATURA CITADA.....	47
9. FIGURAS.....	58
10. TABLAS.....	63
11. ANEXOS.....	68

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Estipula cortada para toma de muestra, foto de <i>Phytelephas aequatorialis</i>	58
FIGURA 2: Izq. superior: semilla de tagua, Izq. inferior: proyecciones cónicas de la infrutescencia, Der. superior: inflorescencia masculina, Der. inferior: infrutescencias en la base de las hojas.....	59
FIGURA 3. Ubicación de los sitios de colección de <i>P. aequatorialis</i> (obtenida del programa Google Earth).....	60
FIGURA 4. PCoA realizado con la matriz de <i>Fst</i> obtenida en Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005) entre 10 localidades de <i>P. aequatorialis</i> , generado con el programa GenAlex.....	60
FIGURA 5. PCoA realizado con la matriz de <i>D</i> (Jost, 2008) entre 10 localidades de <i>P. aequatorialis</i> obtenido con el programa GenAEx.....	61
FIGURA 6. PCoA realizado con la matriz de <i>G</i> (Nei) entre 10 localidades de <i>P. aequatorialis</i> obtenido con el programa GenAEx.....	61
FIGURA 7. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética con el estadístico <i>Fst</i> obtenido con el programa GenAEx.....	62
FIGURA 8. Gráfico de porcentajes de variación molecular (AMOVA). Obtenido con el programa GenAEx.....	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descripción general de las localidades muestreadas para <i>Phytelephas aequatorialis</i> Spruce.....	63
Tabla 2. Valores p del análisis de desequilibrio ligado para cada par de locus en todas las localidades (método de Slatkin, M. 1994a) de <i>P. aequatorialis</i> obtenidos con el programa Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005).....	63
Tabla 3. Resumen de los resultados de diversidad genética de <i>P. aequatorialis</i> de todas las localidades obtenidos con los programas Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005) y HWE con Genepop (Raymond y Rousset, 1995a).....	64
Tabla 4. Composición genética por locus de <i>P. aequatorialis</i> obtenidos con el programa Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005), HWE obtenido con GenePop (Raymond y Rousset, 1995a).....	65
Tabla 5. Matriz de valores F_{st} con su respectiva significación estadística al 5% y distancia geográfica (km) entre localidades de <i>P. aequatorialis</i> obtenida en el programa Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005).....	66
Tabla 6. AMOVA de las localidades de <i>P. aequatorialis</i> calculado en el programa Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005).....	67
Tabla 7. AMOVA de individuos de <i>P. aequatorialis</i> calculado en el programa Arlequin (Excoffier <i>et al.</i> , 2005).....	67

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN manual (Doyle y Doyle modificado).....	68
Anexo 2. Información de 7 locus microsátélites utilizados en amplificación cruzada con <i>P. aequatorialis</i> . (Gaitán <i>et al.</i> , 2003).....	69
Anexo 3. Primers polimórficos utilizados en <i>P. aequatorialis</i> con su respectivo protocolo PCR.....	70
Anexo 4. Proceso estandarizado de electroforesis en gel de acrilamida, preparación de geles y corrida de PCR.....	74
Anexo 5. Glosario.....	78

1. RESUMEN

Los remanentes de vegetación en el litoral ecuatoriano y en las estribaciones andinas occidentales albergan las últimas poblaciones de palmeras en esta región; si estas zonas son transformadas a tierras agrícolas, una parte importante de su base genética habrá desaparecido. El 75% de la cobertura vegetal de la costa y las estribaciones occidentales han sido deforestadas, fragmentando a las poblaciones de tagua, aislándolas en pastizales, en bosques degradados y en sistemas de manejo. La tagua (*Phytelephas aequatorialis* Spruce) es importante por ser una especie endémica del Ecuador y además porque provee varios productos forestales no maderables que benefician económicamente a personas que conviven con el recurso, también es un componente esencial de los bosques tropicales ya que tiene relaciones directas con la fauna. Este estudio presenta un análisis de diversidad y estructura genética de 10 localidades de tagua usando 7 microsatélites para evaluar su capacidad de resiliencia. Se encontró que las localidades poseen alta diversidad genética ($H_e=0.666$, $A=5.234$), se encontraron valores de diferenciación genética bajos pero significativos, la mayor variación génica se da dentro de cada localidad que entre localidades, el índice de endogamia es bajo ($F_{is}=0.054$), sugiriendo un alto nivel de flujo génico entre localidades. Los resultados indican que la polinización por insectos juega un rol importante en la estructura genética de las localidades. La alta incidencia de heterocigotos encontrados es favorable para la conservación y los bajos valores de F_{st} es favorable para su conservación in situ.

El estudio provee información para la toma de decisiones en planes de conservación y manejo de las localidades de tagua, se deben generar estrategias de cosecha y cultivo que no afecten el reclutamiento de nuevas semillas, mantener viables a las localidades para sustentar los beneficios que brinda al ecosistema a lo largo del tiempo.

2. ABSTRACT

The remnants of vegetation in the Ecuadorian coast and western Andean slopes are home to the latest palm localities in this region; if these areas are converted to agricultural land, an important part of the genetic basis will be gone. 75% of the cover vegetation of the coast and the western slopes has been deforested, a large fraction of the locations of tagua are in pasture, degraded forests and management systems. *Phytelephas aequatorialis* is important since it is endemic to Ecuador and because it provides several non-timber forest products that benefit people who rely on these services, it is also an essential component of tropical forests as it has direct relationships with fauna.

An analysis of diversity and genetic structure of 10 locations in tagua with 7 microsatellite where reported and his resilience was evaluated. Were found high genetic diversity localities ($He = 0.666$, $A = 5.234$), low but significant values of genetic differentiation was found, most genetic variation occurs within the locality than among localities, under inbreeding index ($Fis = 0.054$), suggesting a high level of gene flow between locations. The results indicate that insect pollination plays an important role in the genetic structure of the localities. The high incidence of heterozygotes found is favorable for the conservation and low Fst values is favorable for conservation in situ.

The study provides information for decision-making for conservation planning and management of the locations of tagua, strategies for crop harvesting should develop which do not affect the recruitment of new seeds, maintain viable localities to support the benefits provided to the ecosystem over time.

3. INTRODUCCIÓN

La estructura genética es la cantidad y distribución de la diversidad génica dentro y entre localidades de una especie en particular (Cruse-Sanders y Hamrick, 2004). Esta diversidad genética cambia y evoluciona en función de procesos como flujo génico, deriva génica, endogamia, migración, etc; fuerzas que tienden a cambiar las frecuencias génicas de las localidades (Schaberg *et al.*, 2008, Namoff *et al.*, 2011).

Los patrones de distancia de polinización y dispersión de semillas influyen principalmente a la estructura genética de las plantas en una localidad natural (Elchibli y Korpelainen, 2008). Localidades que no poseen estructura genética están asociadas con una dispersión de semilla aleatoria y amplia. Cuando la dispersión de semillas y polen es restringida, la endogamia generará una intensa estructuración genética en la localidad (Siong y Leong, 2006; Dick *et al.*, 2008). Las consecuencias ecológicas de la dispersión y polinización se evidencian cuando suponen un cambio en las frecuencias alélicas o distribución de los genotipos entre y dentro de las localidades (Loveless y Hamrick, 1984; Escudero *et al.*, 2003).

En árboles tropicales uno de los vectores dominantes del flujo génico es el polen por sus efectos en las características genéticas de las localidades (Lowe *et al.*, 2005). Los mecanismos de polinización determinan aspectos de sistema de reproducción, estructuración y la forma en que los individuos recombinan sus genes en eventos sucesivos de reproducción (Silva *et al.*, 2008).

Por ejemplo, limitaciones en el flujo génico, inducen el apareamiento entre individuos geográficamente próximos lo que provoca una estructura genética local que favorece la divergencia genética de las localidades pero también la endogamia y deriva génica (Wright, 1943). En contraste, cuando existen mecanismos eficaces de dispersión de polen a

media y larga distancia, con altos niveles de flujo génico, se incrementa la base genética, se reduce la endogamia y se mantienen localidades biológicamente viables y genéticamente homogéneas (Lowe *et al.*, 2005).

Únicamente la dispersión de larga distancia del polen y valores altos de heterocigocidad pueden producir índices de endogamia bajos (*F_{is}*). La causa más importante para generar índices de endogamia negativos (sugiere poca endogamia), dando exceso de heterocigotos, es si el polen se mueve distancias largas y las semillas muy poco, que a su vez también pueden ser generados por apareamiento selectivo (Eguiarte *et al.*, 1992).

La agregación de individuos en especies con baja densidad local presentan estimados de mayores distancias de dispersión de genes, asociado generalmente con una limitada dispersión de semillas favoreciendo a la dispersión del polen (Dick *et al.*, 2008). Este incremento del flujo de polen aparentemente facilita a los individuos remanentes del árbol *Swietenia humilis*, persistir como una meta población a pesar de haber sufrido fragmentación severa, manteniendo e incrementando la variación genética debido a una extensa red de intercambio de genes, manteniendo altos niveles de diversidad genética a través de todos los fragmentos. Se sugiere que este flujo génico es facilitado por el movimiento de polinizadores entre árboles aislados asistido por el viento (Lowe *et al.*, 2005).

Estudios de árboles tropicales con bajas densidades poblacionales, sugieren que los árboles reciben polen a través de largas distancias (Conte *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005; Renau-Morata *et al.*, 2005; Sezen *et al.*, 2007; Dick *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2008; Karubian *et al.*, 2010; Barfod *et al.*, 2011). Debido al flujo extensivo del polen, vida extensa y alta diversidad genética, que poseen los árboles en general, serán menos vulnerables a cambios antropogénicos que otros organismos, a pesar de que esto no aplica a especies de árboles

que dependen de animales para todos los aspectos de su reproducción y regeneración (Dick *et al.*, 2008).

La dispersión de las semillas por vertebrados supera el 85% en bosque tropical lluvioso teniendo un mayor impacto en el reclutamiento de nuevas semillas, flujo génico y estructura genética en plantas (Karubian *et al.*, 2010). Especies de árboles tropicales tienen múltiples agentes dispersores de semillas y estrategias eficientes de movimiento a través de largas distancias, como en muchas especies dioicas que tienen frutos carnosos (Dick *et al.*, 2008).

Una disminución de la distancia de individuo a individuo, interpretada como una limitación de la dispersión de semillas genera una estructuración genética (Lowe *et al.*, 2005). A pesar de que el movimiento del polen sea aleatorio o de larga distancia se generará estructuración debido a una dispersión de semillas restringida (por gravedad, roedores o el viento, en el caso de semillas pesadas) (Dick *et al.*, 2008). A diferencia de localidades de dispersión de semilla de larga distancia con flujo limitado de polen, no tendrán estructura porque individuos cercanamente relacionados estarán ampliamente distribuidos (Dick *et al.*, 2008). Diez especies distribuidas alrededor de las áreas Paracou y Counami, nueve especies en *Paracou* y cuatro especies en *Counami* en la Guyana Francesa, poseen una débil estructura genética ya que producen semillas de dispersión de larga distancia (aves, murciélagos, mamíferos arbóreos o el viento) (Hardy *et al.*, 2006).

3.1. Inflorescencia y su relación con polinizadores

Las palmas son principalmente polinizadas por insectos, 29% son polinizadas por escarabajos, 26% por abejas, 8% por moscas, 7% por viento y 3% por mamíferos (Barfod *et al.*, 2011). La visita de insectos a la inflorescencia de la palma varía en términos de

riqueza de especies y abundancia. El número de insectos que visitan la inflorescencia varía de 10 en *Geonoma irena* a más de 10000 en *Phytelephas tenuicaulis* (Barfod *et al.*, 2011).

Los visitantes más comunes de las flores de las palmas son los gorgojos (familia Curculionidae), constituyen la familia más larga de organismos vivientes en la tierra con aproximadamente 48000 especies. Otro grupo frecuente de visitantes son los escarabajos de savia (Nitidulidae) que tienen un mayor rol en el mecanismo de polinización de las palmas *Attalea phalerata*, *Phytelephas tenuicaulis* y *Ceroxylon quindiuense* (Barfod *et al.*, 2011).

La inflorescencia y flores son importantes conductores del polinizador en la mayoría de árboles y principalmente en palmas. La inflorescencia de la palma nace lateralmente en el tallo y está expuesta a varias alturas, por ejemplo en *Calamus acanthophyllus* desde el piso y en más de 50 m en *Ceroxylon quindiuense*. Su estructura y fenología es de importancia para atraer polinizadores y para proteger estructuras sexuales del ataque de herbívoros (Barfod *et al.*, 2011).

Las inflorescencias de tamaño largo juegan un rol importante en atraer a los polinizadores a localidades dispersas, esto se aplica en algunas situaciones naturales (no puede ser generalizada) (Barfod *et al.*, 2011). Mustajarvi (2001) sugiere que el tamaño pequeño de las inflorescencias es un factor que reduce las tasas de visita de los polinizadores (animales que varían en tamaño y densidad poblacional) a las localidades, por ende en localidades pequeñas y aisladas los niveles de endogamia serán más altos. La abundancia del polinizador disminuye en función del tamaño del hábitat, por ejemplo las plantas diseminadas producen pocas semillas pesadas pero con un éxito de reproducción más alto (Mustajarvi *et al.*, 2001).

Localidades extensas son más atractivas para los polinizadores resultando en un mayor número de visitas y subsecuentemente aumento del éxito de polinización, a diferencia que en localidades pequeñas la transferencia de polen puede ser insuficiente y disminuye el conjunto de semillas. Como en los polinizadores de *Lychnis viscaria*, los abejorros (*Bombus* spp.), han sido reportados en su mayoría que prueban más flores de inflorescencias de largo tamaño y en localidades dispersas (Mustajarvi *et al.*, 2001).

3.2. Exogamia

Estudios genéticos han mostrado que los árboles de bosques tropicales son predominantemente exogámicos (González-Pérez *et al.*, 2004; Lowe *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2008; Dick *et al.*, 2008). Se define exogamia como cruzamiento entre individuos de distinta raza, comunidad o localidad, que conduce a una descendencia cada vez más heterogénea. Una localidad exogámica tiene extensivo flujo génico, bajos índices de endogamia, poca diferenciación genética, baja densidad poblacional entre sitios (Eguiarte *et al.*, 1992) y mantienen altos niveles de diversidad genética (Dick *et al.*, 2008).

En árboles *Platypodium elegans*, se encuentran altas tasas de heterocigocidad, en genotipos de plántulas más del 80% y en semillas existe 60% de heterocigocidad (Dick *et al.*, 2008). Mayor heterocigocidad en plántulas, podría ser explicado por una selección en contra de las semillas homocigotas donde muchas son abortadas o poseen bajos pesos comparadas a semillas exogámicas, prevalencia de mecanismos de auto incompatibilidad y posiblemente segregación de género (Dick *et al.*, 2008). Investigaciones de árboles evidencian genotipos heterocigotos que están siendo favorecidos a una mayor respuesta óptima frente a cambios ambientales por selección natural (Eguiarte *et al.*, 1992; Lowe *et al.*, 2005).

Astrocaryum mexicanum y *Euterpe edulis* son ejemplos de palmas de sistema reproductivo exogámico con procesos similares de árboles tropicales, tienen baja diferenciación genética (F_{st}) entre parcelas, valores de endogamia (F_{is}) típica y significativamente positivos sugiriendo poca endogamia, poseen diferencias en frecuencias alélicas y en distancias genéticas (Eguiarte *et al.*, 1992, Gaiotto *et al.*, 2003; González-Pérez *et al.*, 2004; Montúfar y Barreiro, 2010). *Astrocaryum mexicanum* reportó incremento de heterocigocidad de semillas a adultos, *E. edulis* aumentó de plántulas a adultos debido su adaptación a condiciones locales. El pool génico del polen es diferente en frecuencias alélicas de semillas y plantas adultas, la heterocigocidad es menor debido al extensivo movimiento del polen (Eguiarte *et al.*, 1992).

Esto genera selección en contra de individuos homocigotos (Gaiotto *et al.*, 2003) y exceso de heterocigotos favoreciendo ciertos alelos por el proceso de reclutamiento (Conte *et al.*, 2003; Gaiotto *et al.*, 2003). Por ejemplo en *E. edulis* parece tener superposición de generaciones dentro de cada categoría estudiada y tiene una gran capacidad de restaurar los valores de diversidad, incluso después del proceso de explotación. Los individuos con una alta tasa de crecimiento pueden tener una mejor oportunidad para alcanzar la etapa adulta, dándose una selección de rasgos adaptativos (Conte *et al.*, 2003).

3.3. Efecto antropogénico sobre la estructura genética

Los árboles tropicales pueden ser vulnerables a impactos de degradación de hábitat, fragmentación, efectos de borde y aislamiento. Vulnerables debido a sus características demográficas y reproductivas, baja densidad poblacional, sistema de apareamiento de auto incompatibilidad, altos rangos de heterocigocidad e íntimas interacciones con polinizadores y dispersores de semillas (Lowe *et al.*, 2005). Estos impactos provocan erosión de la diversidad genética, mayor diferenciación genética entre localidades,

incremento del número de homocigotos (Namoff *et al.*, 2011), incremento aleatorio de deriva génica, mayor endogamia y reducción del flujo génico (Lowe *et al.*, 2005). En la naturaleza se evidencia con una mayor mortalidad de semillas, crecimiento lento, disminución en fecundidad, tamaño de progenie y crecimiento o sobrevivencia, así como también cambios en la edad de madurez y deformidades físicas (Gaitán *et al.*, 2003), árboles de antiguo crecimiento y alteraciones en la dispersión de semillas debido al agotamiento de las localidades dispersoras (Montúfar *et al.*, 2011).

En *Cedrela balansae* una especie con importantes características madereras, se reportó que su diversidad genética está siendo afectada por la gran accesibilidad a las localidades, sobreexplotación y extracción selectiva (Soldati *et al.*, 2013). La tala selectiva tiene directo impacto en la demografía y genética de las localidades de árboles explotados, reduciendo la densidad de la localidad de árboles reproductivos e incrementando la distancia entre individuos reproductivamente relacionados (Silva *et al.*, 2008). Causa pérdida de algunos alelos raros, se remueven individuos adultos que poseen genes que podrían contribuir más a la reproducción que genes de individuos juveniles, además se eliminan potenciales combinaciones genéticas con valor adaptativo para una respuesta a cambios ambientales (Namoff *et al.*, 2011).

El flujo del polen de localidades aledañas puede compensar la pérdida de alelos en dicha localidad. Esos alelos probablemente no se perderán de toda la localidad debido a su presencia en individuos juveniles y plántulas. La brecha de reclutamiento típico de especies pioneras, acoplado con la longevidad de las semillas en el suelo podría ayudar a reducir los riesgos de pérdida de alelos (Silva *et al.*, 2008). Las adaptaciones locales pueden fortalecerse por la fragmentación del hábitat y la degradación de los bosques, disminuyendo la aptitud de las semillas fertilizadas por polen inmigrante o la descendencia de una semilla inmigrante (Lowe *et al.*, 2005).

La disminución de la aptitud se da por la eliminación de alelos adaptados localmente o por la ruptura de complejos de genes adaptados debido a cruzamiento entre genotipos de diferentes lugares, fenómeno conocido como depresión exogámica (Lowe *et al.*, 2005). En plantas *Carapa guianensis* de localidades de bosques en Costa Rica, la reducción de la densidad poblacional por fragmentación disminuyó la diversidad alélica de bosques de plántulas taladas por un limitado flujo génico debido a menor flujo de polen (Mustajarvi *et al.*, 2001), este fenómeno no fue evidenciado en localidades conservadas (Lowe *et al.*, 2005). Se presentan obvios efectos en las interacciones del sistema de reproducción de la planta entre polinizador afectando la densidad de potenciales cruzamientos dando patrones espaciales de flujo génico (Dick *et al.*, 2008; Mustajarvi *et al.*, 2001).

Cerca del 60% de la cubierta mundial de bosque tropical está en un estado de degradación o se somete a una sucesión secundaria, mundialmente solo una pequeña fracción de las áreas deforestadas es regenerada como bosque de crecimiento secundario (Cruse-Sanders y Hamrick, 2004). Muchos países tropicales ahora tienen más cubierta de bosque de crecimiento secundario que de primario. Bosques secundarios juegan un rol crítico en la conservación de especies y en la diversidad genética de paisajes tropicales (Sezen *et al.*, 2007). Proveen servicios al ecosistema como estabilización de suelos, secuestro de carbono, regulación de ciclos hidrológicos, proporcionan una variedad de productos forestales (maderables y no maderables) y constituyen plantillas de diversidad genética existente, con los cuales se podría componer los bosques tropicales del futuro con las especies más viables (Gaitán *et al.*, 2003; Sezen *et al.*, 2007).

Para evitar una disminución mayor de los niveles de diversidad genética, que llevaría a una pérdida del potencial de adaptación, es necesario mantener la diversidad genética existente, tomando medidas de conservación como protección *in situ*, bancos clonales y huertos semilleros (Soldati *et al.*, 2013). Resaltando la necesidad de obtener información de

diversidad genética para determinar el estado de conservación de localidades de especies naturales (Silva *et al.*, 2008).

3.4. Importancia de la diversidad genética en las localidades

La diversidad genética es primordial debido a que posterior a la exposición de una variedad de fuerzas selectivas ésta provee salud, supervivencia, desarrollo de resiliencia y productividad a los bosques de todas las localidades biológicas (Schaberg *et al.*, 2008). Por lo tanto, es la base para la adaptación y resistencia al estrés ambiental, ayudando a las especies y a los ecosistemas a responder frente a cambios climáticos, contaminación, invasiones y enfermedades (Montúfar y Barreiro, 2010).

La resiliencia ecológica se define como la capacidad de resistencia de las localidades a las perturbaciones del medio ambiente, sin pérdida significativa de funciones biológicas. La diversidad genética es uno de los componentes de la resiliencia a nivel de individuos y localidades (Schaberg *et al.*, 2008).

Raramente se dirigen los esfuerzos de conservación sobre individuos, es más frecuente enfocarse en localidades, por lo que el conocimiento de genotipos individuales puede ser una importante herramienta en programas de mejoramiento (Gaitán *et al.*, 2003).

3.5. Especie de estudio: *Phytelephas aequatorialis* Spruce

3.5.1. Distribución y taxonomía

La palmera *Phytelephas aequatorialis* localmente conocida como tagua o cade, es endémica de las regiones tropicales y subtropicales de las estribaciones occidentales y orientales de la Costa ecuatoriana. Crece en un amplio rango ecológico y altitudinal que puede ir desde el borde del mar hasta los 1800 m.s.n.m. en las estribaciones andinas occidentales (Borchsenius y Moraes, 2006). La tagua está presente en bosques caducifolios

del litoral de Manabí, bosques de garúa, bosques tropicales de tierras bajas en Esmeraldas, bosques premontanos (< 1000 m) y bosques montanos (Montúfar *et al.*, 2013).

Extensas localidades de tagua son reportadas en el bosque tropical de la provincia de Esmeraldas, en bosques deciduos y semideciduos (región septentrional y central de Manabí), en bosques de garúa (Parque Nacional Machalilla) y en regiones colinadas y valles húmedos de la provincia de Manabí (Junín, San Plácido, Pichincha). Otras localidades importantes se encuentran en las estribaciones occidentales de las provincias de Pichincha (Puerto Quito), Santo Domingo de los Tsáchilas (Alluriquín), Imbabura (El Chontal), Bolívar (Balzapamba), Cotopaxi (Otonga), Azuay (Molleturo) y El Oro (Piñas) (Montúfar *et al.*, 2013).

En amplias zonas del país la tagua mayormente crece en sistemas silvo-pastoriles y agroforestales. Localidades naturales de tagua son protegidas dentro del Parque Nacional Machalilla, de la Reserva Mache-Chindul, la Reserva Cotacachi-Cayapas y la Reserva privada Buenaventura (Montúfar *et al.*, 2013).

3.5.2. Características morfológicas

Es una palmera dioica, solitaria con tallos café oscuros de 1-8 m de alto y 10-20 cm de diámetro, hojas erectas con folíolos en grupos de 4-7 y proyectados en varios planos de orientación (Montúfar *et al.*, 2013; Figura 1).

La inflorescencia masculina de la tagua es en forma de espiga péndula alargada de color amarillo a crema, con flores masculinas prominentes de 1-1.5 cm de largo. La inflorescencia femenina mide de 35-40 cm, puede llegar a medir hasta 2.5 m de largo y 20 cm de diámetro, aparece entre la base de las hojas cubierta por las fibras de los pecíolos foliares. Infrutescencia es grande (25-40 cm de diámetro) y esférica con proyecciones

cónicas de 1-2 cm (Acosta-Solís, 1948), cada infrutescencia con 7-22 frutos y cada fruto con 5-8 semillas (Montúfar *et al.*, 2013; Figura 2).

3.5.3. Biología y ecología

La estructura poblacional de la tagua varía en función del tipo de hábitat. En sistemas agroforestales, arboledas, pastizales o bosques secundarios, existe una alta densidad de juveniles (individuos >1 m sin tronco visible) frente a adultos (individuos con tronco visible y con órganos reproductivos, hasta 30:1, juveniles/adultos) pero hay una ausencia casi total de subadultos (individuos con troncos pero sin órganos reproductivos) (Velásquez-Runk, 1998; Jácome, 2013).

La estructura poblacional de la tagua en bosques maduros se caracteriza por una baja densidad de individuos en todos los estadios de crecimiento, la relación entre adultos, subadultos y juveniles es más equilibrada (15:1, juveniles/adultos; Velásquez-Runk, 1998; Jácome, 2013). Además la abundancia de individuos es mayor en colinas y laderas que en áreas inundadas, donde la densidad de juveniles es considerablemente menor (Velásquez-Runk, 1998).

Como el 75% de la cobertura vegetal de la Costa y las estribaciones occidentales ha sido deforestada (Sierra, 1999b) una importante fracción de las localidades de tagua se encuentra en pastizales, bosques degradados y sistemas de manejo. La ausencia de subadultos en estas localidades limita críticamente su regeneración natural y es un síntoma de que tales localidades no son viables, lo que pone en serio riesgo la conservación de la especie y su variabilidad genética (Montúfar *et al.*, 2013).

El uso del bosque afecta la proporción de sexos en las localidades de tagua. En bosques de manejo (arboledas con o sin remoción, sistemas agroforestales) la proporción de individuos femeninos es mayor que la de masculinos. Esta desviación está relacionada con el interés

del campesino por dejar en pie individuos femeninos productores de tagua en detrimento de los masculinos. En localidades de la provincia de Manabí, donde el aprovechamiento del recurso está dirigido a la cosecha de hojas provenientes de individuos masculinos (cade), la proporción de sexos se mantiene cerca del equilibrio 1:1. El efecto de la desviación en la proporción de sexos no ha sido estudiado, pero a futuro ésta podría tener impactos negativos en la estructura genética de las localidades (Montúfar *et al.*, 2013).

Su desarrollo vegetativo no ha sido investigado, sin embargo observaciones indirectas sugieren que la tagua requiere 10 años para alcanzar el desarrollo morfológico completo (subadulto) y demora 14-15 años en alcanzar su madurez sexual y reproductiva (Velásquez-Runk, 1995). Se puede calcular en 35-40 años la edad de individuos con troncos de dos metros de alto (Acosta-Solís, 1948). Asimismo, para la especie *P. seemannii* se ha reportado que requiere 24 años para iniciar la fase reproductiva (Bernal y Ervik, 1996).

3.5.4. Polinización de *Phytelephas*

En polinización de especies de palmas se ha visto que varias especies de insectos se alimentan de varias flores, mostrando baja especialización (Barfod *et al.*, 2011). La inflorescencia masculina atrae una gran diversidad de insectos como coleópteros, dípteros, himenópteros y arácnidos. Los escarabajos de la sabia que comprenden 3000 especies, son típicamente atraídos por materia vegetal en descomposición, *Mystrops* y *Epurea* ambos son visitantes de inflorescencias y usualmente se les atribuye un rol mayor en mecanismos de polinización en *Attalea phalerata*, en *Phytelephas tenuicaulis* y en *Ceroxylon quindiuense*. Los escarabajos estafilínidos (*Amazoncharis* y sus depredadores *Xanthopygus*) pertenecientes a la subfamilia Aleocharinae son el polinizador principal de *Phytelephas seemanni* (Bernal y Ervik, 1996).

La termogénesis un fenómeno de incremento del calor de la flor para aumentar las tasas de polinización durante la antesis, parece ser particularmente disperso entre las tribus Cocoseae y Phytelepanteae (Trisha y Godfrey, 2001; Barfod *et al.*, 2011). Las consecuencias ecológicas de la termogénesis probablemente varían entre palmas, las más importantes son: estimulación de polinizadores a salir de la inflorescencia, difusión del aroma floral y el calor como un factor de crecimiento del tubo polínico de la flor, crecimiento de los huevos y las larvas de polinizadores (Barfod *et al.*, 2011).

Especies de la tribu Phytelepheeae poseen inflorescencias masculinas de corta duración que durante la antesis poseen una temperatura más elevada de entre 10 a 20 °C en comparación a la temperatura ambiente, también constituyen lugares de ovoposición dando recompensa a insectos que las perforan. La antesis suele durar menos de 12 horas y la inflorescencia comienza a desintegrarse poco después (Barfod *et al.*, 2011).

Se sugiere que la diferenciación local en la composición del aroma floral constituye un mecanismo de aislamiento que puede resultar en una especiación simpátrica. Varios componentes activos atraen polinizadores de diferentes especies. El aroma de la flor de *Aphandra* fue dominado por pirazina un compuesto orgánico aromático, *Ammandra* emite un rango de hidrocarburos sesquiterpénicos y el mayor componente en *Phytelephas* es p-metilanisol, en grandes cantidades, para atraer coleópteros de los géneros *Aleocharinae* (Staphylinidae), *Derelomini* (Curculinoidae) y *Mystrops* (Nitidulidae) que polinizan las flores y se reproducen en las inflorescencias masculinas (Barfod *et al.*, 2011).

Una revisión (Barfod *et al.*, 2011) muestra que muchas palmas dependen altamente de los servicios de polinización de solo una especie de insecto. Se proveen ideas de la habilidad de las palmas de atraer polinizadores a comparación de otras plantas con flor, se muestra

como las agrupaciones de insectos en el bosque tropical pueden influenciar en el éxito reproductivo de las palmas (Barfod *et al.*, 2011).

3.5.5. Productividad de *Phytelephas aequatorialis* para la obtención de tagua

Phytelephas aequatorialis es un recurso forestal no maderable (PFNM) y reporta múltiples usos. Los principales productos comercializados son: la tagua (endospermo solidificado) cosechada de las palmas hembra y el cade cosechada de las palmas macho (Velásquez-Runk, 1998).

Con el endospermo solidificado derivado de los frutos de *P. aequatorialis* se ha generado una industria de producción de precursores de botones (animelas). Aproximadamente de cada semilla de tagua se generan de 2-4 animelas; esta industria genera un excedente de desperdicios, como el polvillo que es utilizado como balanceado y los anillos como combustible para las industrias locales (Brokamp *et al.*, en preparación).

Otro importante producto derivado de la tagua son las artesanías y bisuterías, actividad ejercida principalmente por microempresas de carácter familiar o comunitario (Velásquez-Runk, 1998), donde los productores pequeños generan ingresos mensuales de alrededor de 150 a 400 USD mientras que talleres medianos ingresos de 1000 a 5000 USD por mes (Brokamp *et al.*, 2014).

Actualmente, el principal producto de exportación derivado de la tagua son las animelas o botones semiprocesados, su precio de exportación incrementó alrededor del 60% en los cinco últimos años, pero la cantidad exportada disminuyó considerablemente en 2012. Esto indica que la oferta actual de animelas no satisface la demanda en el mercado internacional (Brokamp *et al.*, 2014).

El precio por kilogramo de tagua es variable siendo uno de los principales problemas para la industria botonera. El precio se fija en función de los exportadores, quienes dependen del valor establecido en el mercado internacional (Montúfar *et al.*, 2013). Estas variaciones en la demanda internacional de animelas afectan económicamente a todos los componentes de la cadena de valor, desde el campesino en las estribaciones andinas, los talleres fabricantes de animelas en Manta o Portoviejo, los exportadores y los compradores de prendas de vestir (Brokamp *et al.*, 2014). Por lo que en la actualidad la cosecha y venta de tagua no es rentable para el campesino (Montúfar, 2013).

Una tagua hembra puede producir hasta 16 infrutescencias anualmente y una infrutescencia puede llegar a pesar de 8-15 kilogramos. Cada una tiene de 20-30 frutos oblicuos, maderables y con protuberancias cónicas en la superficie (Acosta-Solís, 1948; Figura 2). En sistemas agroforestales se han encontrado 21-25.6 frutos por infrutescencia con 4.4-6 semillas por fruto y en bosque secundario de 18.9-25.2 frutos por infrutescencia con 4.4-5.8 semillas por fruto (Jácome, 2013; Brokamp *et al.*, 2014). Se necesitan por lo menos de 10-11 infrutescencias para obtener un quintal (45.36 Kg) de semillas (peso seco) con cáscara (Acosta-Solís, 1948). El tiempo de maduración de una infrutescencia, desde flor hasta la formación de la semilla pétrea (tagua), es de 3-5 años (Jácome, 2013).

Los campesinos prefieren dejar podrir la semilla de tagua sobre sus campos que obtener ganancias mínimas por su cosecha, inclusive llegando a actitudes destructivas como talar los individuos hembra para reducir la oferta e incrementar el precio de la materia prima (Montúfar, 2013). Debido al irrisorio beneficio económico que brinda la cosecha de la semilla de tagua ha sido favorecido el incremento de la cosecha y oferta de las hojas de cade, actividad económicamente más rentable, pero con un efecto negativo para la supervivencia del individuo (Montúfar, 2013).

La cosecha de las hojas de *Phytelephas aequatorialis* (cade) para la construcción de techos es una importante actividad económica a nivel local. Es una forma de extractivismo destructivo, puesto que la actividad implica el corte casi total de las hojas de la corona de la palma adulta (Jácome, 2013; Brokamp *et al.*, 2014). Preferentemente su cosecha se realiza en sistemas mixtos pastizal-agroforestal y arboledas de tagua. Por el contrario, en los bosques naturales donde la densidad de individuos adultos es muy baja su cosecha se realiza esporádicamente y por lo tanto resulta menos rentable para el campesino (Brokamp *et al.*, 2014).

La productividad de hojas es mayor en individuos machos que en hembras (Borgtoft-Pedersen, 1993). Esto tiene una importante implicación en el manejo ya que se cosechan hojas de las palmas macho (cade) para la elaboración de techados. Las hembras invierten más energía en la producción de grandes infrutescencias, pero producen menos hojas y en promedio de menor tamaño (Brokamp *et al.*, 2014).

Los precios de cade en el mercado son atractivos para los cosechadores pese a la demanda fluctuante, así como también lo es para agricultores dueños de localidades de *P. aequatorialis* que les es más rentable vender cade que cosechar tagua (Montúfar *et al.*, 2013). La cosecha de tagua se basa en un sistema de recolección manual, recogen la tagua madura, de textura sólida y color blanco, de alta calidad. Sin embargo, cuando existe una alta demanda y los campesinos no encuentran suficiente tagua, recurren al maceado. Este mecanismo de maduración forzada consiste en cortar toda la infrutescencia todavía inmadura y prenderle fuego o dejarla cubierta con hojas para favorecer una maduración precoz, generando tagua menos sólida, de color marrón y de menor valor (Acosta-Solís, 1948; Brokamp *et al.*, 2014).

Donde se realiza la “limpieza” (corte de vegetación alrededor de la palma) pocas semillas se dejan para germinar, plántulas y juveniles son cortados reduciendo su vigor, pudiendo incrementar la mortalidad y deteriorando el reclutamiento (Velásquez-Runk, 1995). La producción de las semillas de tagua también se ve afectada por la cosecha de las hojas, ya que esta actividad disminuye la producción de infrutescencias y afecta la maduración de las semillas (Brokamp *et al.*, 2014).

Los factores de producción descritos generan un efecto negativo para las localidades de tagua, debido a que se dejan pocas semillas para germinar, desfavoreciendo al establecimiento de nuevos individuos (Velásquez-Runk, 1995). En 1944 se describieron densas localidades de tagua en bosques naturales, debido a la deforestación, la cosecha intensiva e indiscriminada de semillas y hojas ahora la tagua generalmente crece en pastizales, sistemas agroforestales y bosques secundarios donde la regeneración natural está interrumpida (Borgtoft-Pedersen y Skov, 2001). Consecuentemente, la falta de juveniles y subadultos es un cuello de botella para la especie pudiendo afectar su manejo y conservación (Acosta-Solís, 1944; Acosta-Solís, 1948).

Phytelephas aequatorialis está catalogada como una especie casi amenazada según la lista roja de especies de la UICN (Montúfar y Pitman, 2003). Pero se sugiere catalogarla como vulnerable (Brokamp *et al.*, 2014) debido a que es una especie endémica de la Costa del Ecuador cuyos bosques naturales (75%) han sido mayormente deforestados (Sierra, 1999a), existe una sobre explotación del recurso, por lo que un número significativo de localidades naturales han desaparecido (Hernández *et al.*, 2008).

3.6. Marcadores Moleculares

Bakoumé *et al.* (2007) realizó un estudio con microsatélites (*SSRs*) para identificar la diversidad genética de la palma de aceite *Elaeis guineensi*. En este estudio se analizaron 45 localidades nativas africanas, en donde se reportó una desequilibrada distribución de la frecuencia de alelos a través de las localidades, probablemente debido a deriva génica, selección natural y efecto fundador generado por la intervención humana (Bakoumé *et al.*, 2007).

La combinación de un rápido crecimiento poblacional, urbanización, desarrollo de la agricultura y un mal manejo del recurso, han generado estas diferencias, concluyendo que 22 de las 45 localidades deben ser conservadas, ya que son alélicamente diversas y poseen mejores características de productividad (Bakoumé *et al.*, 2007). Por lo tanto, se afirma la importancia de obtener información de diversidad genética mediante los microsatélites para generar estrategias de conservación.

3.6.1. Microsatélites como marcador molecular

Dayanandan *et al.* (1997) y Billote *et al.* (2004) realizaron estudios donde evidenciaron el potencial de transferibilidad de los marcadores microsatélites a través de taxas cercanamente relacionados. Esto lo corrobora Radosavljevic *et al.* (2012) realizando un estudio donde se desarrollaron nuevos microsatélites a partir de *Salvia officinalis* probados para amplificación cruzada en *Salvia brachyodon*. Donde de 30 microsatélites se obtuvieron 15 con amplificación positiva, lo cual sugiere la posibilidad de comparar variación genética entre especies endémicas y especies de amplia distribución. Demostró que las especies endémicas tienen menos diferenciación genética que las especies de amplia distribución (Radosavljevic *et al.*, 2012).

En el presente estudio se realizó transferibilidad de primers del género *Ceroxylon* que está cercanamente relacionada a *Phytelephas aequatorialis* (Gaitán *et al.*, 2003; Anexo 2). Con el análisis de estos datos se obtuvo la estructura genética de las localidades, permitiéndonos reflejar las interacciones de los diferentes procesos evolutivos.

3.6.2. Estudios Moleculares previos en *Phytelephas aequatorialis*

Debido a la importancia biológica y económica de *P. aequatorialis*, existe información acerca de su morfología, usos y distribución (Acosta-Solís, 1944; Acosta-Solís, 1948; Koziol y Borgtoft-Pedersen, 1993; Velásquez-Runk, 1998). No se tiene conocimiento de su variabilidad y estructura genética, información que constituye una herramienta fundamental para la planificación del uso, manejo y conservación de recursos forestales que permita generar estrategias de protección y preservación de los recursos genéticos de *P. aequatorialis* (Renau-Morata *et al.*, 2005).

La diversidad genética es particularmente crítica para la conservación y manejo de las localidades de *Phytelephas aequatorialis*, por lo que este estudio genético fue encaminado a estimar el nivel y distribución de la diversidad genética de localidades de tagua en la provincia de Manabí.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Aportar al conocimiento de la dinámica de la diversidad genética de *Phytelephas aequatorialis*.

4.2. Objetivos Específicos

Explorar la estructura genética de las localidades de *Phytelephas aequatorialis* en Manabí.

Explorar los patrones de diferenciación, endogamia y diversidad genética entre localidades.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de muestras

El estudio se llevó a cabo sobre varias localidades del noroeste del Ecuador, zonas de bosque húmedo tropical, premontano y zonas donde se encuentran sistemas de agricultura y ganadería que han reemplazado los bosques naturales donde se encontró presente la tagua (*Phytelephas aequatorialis*) en la provincia de Manabí.

5.2. Identificación y colección de muestras

Phytelephas aequatorialis es una palmera de fácil identificación debido a su tamaño medio, hojas erectas, dioica, con un tronco solitario, gran acumulación de materia orgánica en la base de las hojas, su inflorescencia masculina es llamativa debido a su forma en espiga alargada de color amarillo a crema. La infrutescencia es compuesta, formada de frutos cónicos formando una cabezuela esférica de hasta 40 cm de diámetro y recubierto de protuberancias en su exterior, por lo que es sencillo diferenciarlas de otras palmas (Montúfar *et al.*, 2013). Se realizó un muestreo aleatorio, debido a que las localidades de tagua están dispersas.

Se colectó un fragmento pequeño de la estípula (hoja joven) de cada individuo (Figura 1). Las muestras fueron recolectadas manualmente y recortadas con una podadora. En algunos casos no se pudo tomar hojas de un individuo adulto, por lo que se procedió a tomar hojas de un individuo juvenil y el reconocimiento de las plántulas se lo realizó con ayuda del libro Manual to the Palms of Ecuador (Borchsenius *et al.*, 1998). Mediante el uso de GPS se tomaron las coordenadas de ubicación de cada individuo. Una vez terminada la jornada las muestras colectadas fueron colocadas en sílica gel para su secado y transporte.

La sílica fue removida en varias ocasiones y reemplazada por sílica nueva para que el tejido vegetal se encuentre totalmente seco. Se ingresó las muestras en la base de datos del Laboratorio de Ecología y Genética Molecular de la Escuela de Ciencias Biológicas PUCE (Laboratorio 113), donde constaron coordenadas geográficas del punto en donde se colectó cada muestra y observaciones generales.

5.3. Determinación de sitios de colección

Se seleccionaron 10 localidades según su ubicación en Google *Earth*. La localidad fue definida como una localidad geográfica en donde los individuos están genéticamente relacionados (Figura 3).

Después de realizar el muestreo, se obtuvo un total de 192 muestras en las localidades de Atahualpa (11), Convento (12), Trinidad (12), El Mono (16), Chone (39), Junín (17), Santa Rosa (12), Paján (23) y Ayampe (35) en Manabí y La Palma (15) de Santo Domingo para establecer comparaciones (Tabla 1), localidades definidas por la cercanía de los individuos. Se muestrearon zonas geográficas que difieren en su distancia, coordenadas ubicadas en Google *Earth* (Figura 3).

5.4. Obtención de microsatélites como marcadores moleculares

Se utilizaron marcadores moleculares, específicamente microsatélites (*SSRs*) una herramienta útil para estimar niveles y patrones de distribución de diversidad genética (Anexo 2).

El alto nivel de variación de locus de microsatélites sugiere que son marcadores eficaces para detectar cambios en el tamaño efectivo de la localidad, estructura genética y rangos de endogamia (Conte *et al.*, 2008).

5.5. Pruebas de transferibilidad

Debido a que no existen microsatélites diseñados para *Phytelephas aequatorialis* y aprovechando la característica de los microsatélites de poseer compatibilidad cruzada, se probaron primers de *Ceroxylon alpinum* y *Ceroxylon sasaimae* (Gaitán *et al.*, 2003), que son dos especies de palmas filogenéticamente cercanas a *P. aequatorialis* (Sanín y Galeano, 2011). Se utilizaron en *P. aequatorialis* aquellos que presentaron una amplificación positiva para microsatélites y que demostraron ser polimórficos.

5.6. Extracción de ADN

Se realizó la extracción manual de ADN genómico de las hojas colectadas, siguiendo el protocolo de Doyle and Doyle (1990) modificado y estandarizado para el trabajo con la especie *Phytelephas aequatorialis* (Anexo 1).

5.7. Estandarización de protocolos PCR

Los protocolos a utilizar para el uso de los primers de microsatélites fue el mismo propuesto por sus respectivos autores salvo ciertos ajustes, en concentraciones de Mg, temperatura de annealing y demás variables (Anexo 3).

Se utilizó el ADN aislado para realizar pruebas de amplificación, de esta manera en algunos casos se evidenció la necesidad de realizar diluciones, varias veces a diluciones muy alteradas o por el contrario aumentar el volumen de ADN con el fin de asegurar la amplificación. En algunos casos nunca amplificaron.

Las PCRs fueron realizadas con siete locus de microsatélites (*SSRs*) desarrollados para *Ceroxylon sasaimae* y *Ceroxylon alpinum*. Se realizó amplificación cruzada de 4 de estos primers para *C. alpinum* y 3 primers para *C. sasaimae* descritos por Gaitán (2003). Se modificó los protocolos PCR, adaptados a las condiciones del Laboratorio 113 (Anexo 3).

Se modificó los protocolos PCR, en caso de ser necesario, los primers utilizados fueron polimórficos y de ardua lectura: Cs24, Ca11, Ca13, Ca30, Ca17, Cs30, Cs9 (Anexo 2).

El genotipage se hizo incluyendo datos previamente genotipados en el Laboratorio 113 con el objetivo de ampliar los individuos analizados.

5.8. Visualización en geles y obtención de datos

Para visualizar y cuantificar el ADN obtenido, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio al 5% y una escalera Tracklt 100 pb ADN. Observadas mediante luz UV. Se utilizó 3 ml de ADN y la misma cantidad de buffer de carga (formamida al 98%) que permite que la muestra caiga dentro del pocillo (Anexo 4).

Se denaturaron todas las muestras amplificadas por temperatura (95°C por 5 min), con un agente químico denaturante (formamida al 98%), puesto directamente en el producto PCR para cada muestra (10 ul). Posteriormente se corrió las muestras en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% 5M úrea con la ayuda de una escalera molecular de 330 pb previamente denaturada (72° por 5min). El programa de corrida para el gel con las muestras cargadas fue de 1500V, 50mA y 70W por 2 horas aproximadamente dependiendo del peso del primer utilizado. Para visualizar los fragmentos se realizó una tinción a base de nitrato de plata. Los geles de poliacrilamida, la electroforesis y la tinción se realizaron siguiendo las instrucciones de un proceso estandarizado por el Laboratorio 113 (Anexo 4).

Después de la migración y revelado del gel, se determinó el porcentaje de polimorfismo que presentó el microsatélite, lo cual fue establecido por la variación alélica que exhibían las amplificaciones (Tabla 4).

5.9. Medición y tabulación de datos

Los datos fueron obtenidos de los geles de acrilamida realizados. Se marcó el peso (pb) de las bandas representadas en la escalera molecular de 330 pb y también se marcó las bandas correspondientes a cada alelo, se midió la distancia que habían recorrido desde el frente de migración (a partir del lugar donde inician los pocillos) con la ayuda de una regla para ambos casos. Con los datos obtenidos se realizó un gráfico de dispersión entre la distancia migrada por cada banda de la escalera y su correspondiente peso molecular (pb).

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

Al ser los microsatélites codominantes nos permiten observar los dos alelos presentes en cada individuo para ese locus en particular, razón por la cual los datos obtenidos se los manejaron en una matriz binaria (ausencia y presencia) y posteriormente se los transformó a una matriz alélica en el programa GenAlEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2012) con los tamaños de alelos de todas las muestras en cada uno de los locus. Este programa fue seleccionado porque permite la conversión de datos a los programas GenePop 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995a) y Arlequín 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

5.10. Análisis estadísticos

Se realizó análisis de desequilibrio ligado, de equilibrio Hardy-Weinberg, de diversidad y de diferenciación genética con los programas GenePop 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995a), GenAlEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2012), Arlequín 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) e Isolation by Distance Web Service 3.16 (Jensen *et al.*, 2005).

5.10.1. Análisis de Desequilibrio ligado

Desequilibrio ligado es la asociación no aleatoria de los alelos en dos o más locus (Schwartz *et al.*, 2006). Se realizó un análisis de desequilibrio ligado para comprobar si los diferentes locus se encuentran asociados independientemente entre sí o no. La prueba consiste en una asociación entre pares de locus diploides, descrito como una prueba de desequilibrio ligado compuesto (Weir, 1996).

Para la realización de este análisis se utilizó el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005) comprobando cada par de locus en cada localidad usando el estadístico de relación de probabilidad del logaritmo, con los valores default de los parámetros de la cadena Markov (Número de permutaciones = 10000, Número de espacios en la cadena Markov = 1000000, Número de Dememorizaciones = 100000) (Tabla 2).

5.10.2. Análisis de Equilibrio Hardy-Weinberg

El Equilibrio Hardy-Weinberg es un postulado central en muchos modelos de diversidad y diferenciación genética de localidades. Dadas las frecuencias alélicas iniciales en una localidad, el equilibrio Hardy-Weinberg permite predecir la proporción de genotipos diploides en la siguiente generación bajo panmixia (apareamiento al azar; Lowe *et al.*, 2004). Una localidad diploide se considera en equilibrio Hardy-Weinberg (*HWE*) si los alelos de un locus específico se encuentran distribuidos al azar en una localidad y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres (Hardy, 1908; Weinberg, 1908).

Este equilibrio se manifiesta cuando se observa que las proporciones genotípicas y por lo tanto fenotípicas (respecto a un carácter) de una localidad se mantienen constantes, como consecuencia de esto se asume que la herencia mendeliana (leyes de Mendel) no induce cambios evolutivos por sí misma (Guo y Thompson, 1992; Lowe *et al.*, 2004).

Una localidad en equilibrio mantiene las siguientes condiciones: panmixia (apareamiento al azar entre todos los individuos de una localidad), ausencia de selección (ni sexual ni natural), ausencia de migración o mutación, que el tamaño de la localidad sea efectivamente infinito y que los alelos se segreguen siguiendo leyes de herencia mendelianas (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004). Los principales factores que se encuentran involucrados en las desviaciones del *HWE* son: los apareamientos no producidos al azar (no existe panmixia), la selección natural (ventaja de los heterocigotos), migración o flujo de genes desde una localidad externa, presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente, entre otros (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Se utilizó el programa GenePop (Raymond y Rousset, 1995a) para calcular el equilibrio Hardy-Weinberg mediante una prueba de probabilidad denominada “la prueba exacta Hardy-Weinberg” descrita por Haldane (1954), Guo y Thompson (1992) y Weir (1996) entre otros. Esta prueba permite definir la zona de rechazo utilizando la probabilidad de las muestras observadas, los valores p corresponden a la suma de las probabilidades de todas las tablas con la misma probabilidad. El programa, al identificar más de seis alelos, automáticamente utilizó el algoritmo de cadena de Markov para estimar el valor exacto de los valores p sin ningún tipo de sesgo (Guo y Thompson, 1992). Se utilizó los valores default de los parámetros de la cadena Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000). El programa calculó automáticamente un test global (Método de Fisher) para conocer los valores globales Hardy-Weinberg de cada localidad (Tabla 3).

5.10.3. Análisis de Diversidad Genética

Con el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005) se calculó la diversidad alélica, heterocigocidad observada y esperada. Una de las fórmulas más sencillas de calcular la diversidad genética en localidades es la diversidad alélica (A), que es simplemente el número promedio de alelos por locus. Este método es sensible al tamaño de muestra y variará de acuerdo al número de individuos muestreados (Freeland, 2005).

La heterocigocidad observada (H_o) es dependiente del tamaño de muestra, que es calculada al dividir el número de heterocigotos en un locus en particular por el número total de individuos muestreados (Freeland, 2005). La heterocigocidad esperada (H_e), conocida también como diversidad génica (Nei, 1987), se define como la probabilidad que dos haplotipos al azar sean diferentes dentro de la muestra. Esta es una prueba menos sensible al tamaño de la muestra (Freeland, 2005) y se calcula de la siguiente manera:

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

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

Adicionalmente se calcularon estadísticos F o también llamados índices de fijación, desarrollados por Wright (1951) con el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005). Los estadísticos F proponen medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en localidades, en este caso por medio de dos parámetros: F_{is} y F_{st} (Robertson y Hill, 1984).

Donde F_{is} (coeficiente de endogamia) representa la desviación de las frecuencias genotípicas observadas, respecto a las esperadas considerando el equilibrio Hardy-

Weinberg (Lowe *et al.*, 2004). Describe la divergencia de la heterocigosidad observada dentro de las localidades con la de la localidad total asumiendo panmixia (Lowe *et al.*, 2004). Esto refleja la probabilidad de que dos alelos dentro de un mismo individuo sean idénticos por descendencia y se calcula de la siguiente manera:

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

H_I es la heterocigosidad observada de una localidad en el momento de la investigación, y H_S es la heterocigosidad que podría esperarse si la localidad estuviera en equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005).

Nei (1977) redefinió los índices de endogamia y mostró que los dos estadísticos F pueden calcularse usando la heterocigosidad observada y esperada.

$$F_{is} = 1 - H / H_eS \quad F_{st} = 1 - H_eS / H_eT$$

En donde H_eS es la frecuencia observada de heterocigotos, H_eS y H_eT son la heterocigosidad esperada en equilibrio Hardy-Weinberg. Los F estadísticos permiten conocer la estructura poblacional en presencia y ausencia de selección porque los términos se encuentran definidos por las frecuencias alélicas y genotípicas de la localidad en un momento determinado (Nei, 1977).

El programa calculó un análisis global del F_{is} basado en Weir y Cockerham (1984), con el programa GenAlEx 6.0 se calculó el número de alelos únicos por localidad y GenePop para comparar concordancia en los resultados.

5.10.4. Análisis de Diferenciación Genética

Para calcular la diferenciación genética entre las localidades se utilizó el índice de diferenciación F_{st} . Es un índice de fijación de alelos propuesto por Wright (1951) como

parte de los *estadísticos-F*, es uno de los métodos más comunes utilizados para calcular la diferenciación genética entre localidades. El *F_{st}* describe la reducción de la heterocigosidad dentro de una localidad, con respecto a la localidad total, debido a selección o deriva (Lowe *et al.*, 2004).

F_{st} es la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las sublocalidades respecto a las esperadas considerando el equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005; Robertson y Hill, 1984). Se calcula de la siguiente manera:

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

Donde *H_t* es la heterocigosidad esperada del total de las localidades, y *H_s* es la heterocigosidad que se podría esperar si la localidad está en equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005). Para el cálculo del *F_{st}* entre localidades se utilizó el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005), con 1000 permutaciones y los valores *p* fueron calculados con una significación estadística de 0,05 (Tabla 5).

Este puede ser usado junto a la frecuencia de alelos de un locus para predecir la distribución de las frecuencias de alelos a través de las localidades y en consecuencia entender la evolución en localidades estructuradas. También puede ser interpretado como la pérdida proporcional de heterocigosidad en un locus causado por estructuración espacial de la localidad (Whitlock, 2011).

F_{st} puede ser afectado por todas las fuerzas evolutivas. *F_{st}* incrementa por deriva génica dentro localidades (a través de persistentes pequeños tamaños poblacionales, cuellos de botella o efecto fundador) pero reduce por migración de alelos entre localidades. La mutación puede bajar el *F_{st}*, especialmente porque puede permitir altos niveles de heterocigosidad dentro y entre localidades. La mutación puede disminuir los *F_{st}* formando

localidades divergentes en localidades más similares, si un alelo presente en una localidad es introducida por mutación a otra localidad hermana divergida (homoplasia), la homoplasia puede incrementar el F_{st} (Whitlock, 2011).

Dado que los F_{st} pueden ser medidos fácilmente de múltiples locus en todos los organismos relacionados, la repetitividad a través de los locus para F_{st} hace posible establecer una base neutral para quien quiera inferir selección de algún locus o medir parámetros demográficos. Las tasas de migración y tamaños poblacionales pueden ser estimados de datos genéticos, debido a que de múltiples locus se espera tener información similar, permitiendo la replicación de estos estimados (Whitlock, 2011).

Se utilizó el estadístico D propuesto por Jost (2008) con la finalidad de comparar los resultados. El índice D puede ser calculado de la siguiente manera:

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

Donde H_t es la heterocigosidad total, H_s es la heterocigosidad media de cada localidad y n es el número de localidades (Jost, 2008). Se utilizó el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2012).

Adicionalmente se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con las matrices de F_{st} , D y G en el programa GenAlEx (Peakall y Smouse, 2012). El PCoA es un análisis multivariado que reduce las dimensiones de un set de datos, preservando la mayor cantidad de información posible. Mediante este análisis, los datos se transforman en un sistema de coordenadas (los componentes principales) que son funciones lineales de las variables originales (Jolliffe, 2002).

5.10.5. Análisis de Aislamiento por Distancia

Se realizó un test de aislamiento por distancia para determinar si existe una relación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas. Se utilizó el programa *Isolation By Distance Web Service* con 30000 randomizaciones, las matrices utilizadas fueron la de diferenciación genética con valores *Fst* y una de distancias geográficas entre pares de localidades obtenida con el programa *Google Earth* disponible en la página <http://www.google.es/intl/es/earth/index.html>.

5.10.6. Análisis de Variación Molecular (AMOVA)

Se realizó un AMOVA en el programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005), cuya finalidad es calcular la variación molecular a varios niveles dentro de una especie utilizando datos moleculares. El AMOVA y los niveles de significación estadística se calcularon con 1000 permutaciones (Tabla 6). El AMOVA fracciona toda la diversidad genética entre localidades (Perera *et al.*, 2001).

6. RESULTADOS

6.1. Obtención de ADN

Después de realizar el muestreo, se obtuvo un total de 192 muestras. Teniendo 10 grupos en las localidades de Atahualpa (11), La Palma (15), Convento (12), Trinidad (12), El Mono (16), Chone (39), Junín (17), Santa Rosa (12), Paján (23) y Ayampe (35) (Tabla 3).

La extracción de ADN fue exitosa utilizando el método de extracción manual con el protocolo modificado de Doyle y Doyle (1987) (Anexo 1). Se realizó amplificación cruzada de primers descritos por Gaitán (2003) de las especies *Ceroxylon sasaimae* y *Ceroxylon alpinum*, de las cuales 7 amplificaron para *P. aequatorialis*.

6.2. Análisis Estadísticos

6.2.1. Datos de Desequilibrio Ligado y Equilibrio Hardy-Weinberg

Con una significación estadística de 0.05 se encontraron algunos pares de locus en desequilibrio ligado en cada localidad (Tabla 2). En la localidad Atahualpa se encontraron tres pares de locus en desequilibrio ligado los cuales son Ca17-Cs24, Ca17-Ca11 y Cs30-Cs24. En La Palma se encontró al par de locus Cs30-Cs24 en desequilibrio ligado. En Convento se encontraron 2 pares en desequilibrio ligado, Ca11-Cs24 y Cs9-Ca11. En Trinidad se encontró el par Cs30-Ca11 en desequilibrio ligado. En la localidad El Mono se encontraron dos pares de locus en desequilibrio ligado los cuales son Ca13-Ca11 y Cs9-Ca11. En Chone se encontraron cuatro pares de locus en desequilibrio ligado: Ca11-Cs24, Ca13-Ca11, Ca17-Cs24 y Cs9-Cs24. En Junín se encontraron cinco pares de locus en desequilibrio ligado: Ca30-Ca11, Ca17-Ca11, Ca17-Ca13, Cs9-Ca11 y Cs9-Ca30. En Santa Rosa se encontraron dos pares de locus en desequilibrio ligado, Ca11-Cs24 y Cs9-Ca30. En Paján se encontraron cinco pares de locus en desequilibrio ligado: Ca11-Cs24,

Ca17-Cs24, Ca17-Ca11, Cs9-Cs24 y Cs9-Ca11. Ayampe es la localidad que más pares tiene en desequilibrio ligado, posee seis pares que son Ca13-Ca11, Ca30-Ca11, Ca17-Cs24, Ca17-Ca30, Cs30-Ca13 y Cs9-Ca17. Se obtuvo como resultado que todos los pares de locus tienen algún valor significativo en el análisis de desequilibrio ligado por el método Slatkin (1994a), los locus Cs24 y Ca11 tienen 5 valores significativos cada uno, el locus Ca17 tiene 4 valores significativos, con tres valores significativos por cada uno están los locus Ca13, Ca30 y Cs9, el locus que posee un solo valor significativo es Cs30.

El análisis por el método de Fisher del equilibrio Hardy-Weinberg indica valores altamente significativos con los cuales se pudo comprobar que la mayoría de las localidades se encuentran en desviación del equilibrio Hardy-Weinberg a excepción de la localidad Convento que no presentó valores significativos (Tabla 3). Todos los locus evidencian una desviación significativa del equilibrio *HW* (Tabla 4).

6.2.2. Datos de Diversidad Genética

El número promedio de alelos por locus por localidad es de 5.234 con un rango que va de 4.125 en Convento hasta 6.250 en Ayampe (Tabla 3). El número promedio de alelos por locus varió de 5 en Cs30 a 11 en Cs24, siendo 8 la media de alelos por locus (Tabla 4). En todas las localidades la heterocigosidad observada (*Ho*) fue menor a la heterocigosidad esperada (*He*). La media de *He* es de 0.666 con una desviación estándar de 0.038 y un coeficiente de variación de 0.051. La *He* varió de 0.581 en Convento a 0.715 en Santa Rosa y *Ho* varió de 0.552 en Convento a 0.702 en Santa Rosa (Tabla 3). Ninguna de las localidades posee alelos únicos. Los valores de coeficiente de endogamia variaron desde $Fis = -0.032$ en Santa Rosa hasta $Fis = 0.126$ en El Mono, con un valor promedio de 0.054 (Tabla 3).

6.2.3. Datos de Diferenciación y Variación Genética

Se obtuvo una matriz de datos entre localidades, utilizando el índice de diferenciación genética F_{st} con una significancia de 0.05. Los valores variaron desde 0.021 entre las localidades de El Mono y Chone hasta 0.106 entre el Convento y Atahualpa. Los valores F_{st} fueron bajos y la mayoría mostró valores significativos (Tabla 5). El PCoA realizado con los valores F_{st} indicó un porcentaje de variación en el primer eje de 40.13%; en el segundo eje: 25.97% y en el tercer eje: 20.34% (Figura 4). Los PCoA realizados con los valores D (Jost 2008) y G (Nei 1983) evidencian patrones muy similares (Figura 5 y 6).

En el análisis de AMOVA se obtuvo un 3.13% de variación entre localidades y un 96.87% dentro de las localidades (Tabla 6). En el gráfico (Figura 8) de porcentajes de variación molecular (AMOVA) obtenido con GenAlEx se observa un porcentaje de variación de 6% entre localidades y un 94% dentro de las localidades. Resultados similares se identificaron en el AMOVA de individuos, la mayoría de la variación genética se presenta dentro de los individuos (91.12%) que entre individuos (8.88%) (Tabla 7).

6.2.4. Datos de Auto correlación Espacial

Las distancias geográficas entre localidades variaron de 12.4 Km entre Trinidad y Convento hasta 255 Km entre Ayampe y La Palma. El Test de Mantel muestra una débil y estadísticamente ($r = 0.05$) no significativa correlación entre las distancias genéticas y geográficas (Tabla 5).

En el gráfico (Figura 7) de aislamiento por distancia obtenido del programa *Isolation by Distance Web Service*, utilizando la matriz de distancias geográficas y valores F_{st} , se evidenció una pendiente negativa y una disminución en los valores de diferenciación genética a medida que aumentan las distancias geográficas, sin embargo, no se obtuvo significación estadística en el análisis ($r = -0.144$; $R^2 = 0.0208$).

7. DISCUSIÓN

7.1. Selección de heterocigotos en localidades de *P. aequatorialis* por influencia de polinizadores

La inflorescencia masculina de *P. aequatorialis* atrae una gran diversidad de insectos generando una alta movilidad de polinizadores, que podría promover polinización cruzada y suponer altos niveles de heterocigocidad aumentando la heterogeneidad genética de las localidades (Eguiarte *et al.*, 1992).

Estos patrones fenológicos impactan el comportamiento polinizador y los patrones de flujo génico. En *Phytelephas* la antesis genera una explosión floral, donde un gran número de flores son producidas en una corta franja de tiempo, atrayendo muchos visitantes florales donde el número de insectos que visitan la inflorescencia puede variar hasta en más de 10000 en *Phytelephas tenuicaulis* (Barfod *et al.*, 2011). En esta explosión se genera polinización cruzada al final de cada periodo floral, cuando disminuyen las recompensas florales los polinizadores se ven obligados a visitar flores de otros árboles (Dick *et al.*, 2008).

Debido a la polinización cruzada varios locus pueden estar ligados resultando en hibridación de genotipos, la tagua muestra un número significativo de pares de locus en desequilibrio ligado 12 de 21 pares. El desequilibrio ligado puede ser una de las causas que explique el incremento de heterocigotos (Conte *et al.*, 2003) por sobredominancia asociativa entre marcadores, en consecuencia más aptitud para el heterocigoto y selección en contra de homocigotos (Eguiarte *et al.*, 1992). Santa Rosa y Trinidad muestran 0.715 y 0.703 de heterocigocidad respectivamente, hasta 0.642 en Paján y valores negativos de endogamia (Elchibli y Korpelainen, 2008) como en los valores resultantes de *Fis* negativos por locus Cs24 -0.061, Ca11 -0.226, Ca30 -0.258 y Cs9 -0.259 (Tabla 4). Esta hibridación

puede ocultar alelos deletéreos recesivos en locus heterocigotos múltiples (alelos únicos=0). Se asume que la falta de alelos únicos (Tabla 3) es debido a que la segregación de locus ligados al azar, provoca que todos los alelos estén presentes en todas las localidades de plantas (Dick *et al.*, 2008), como en patrones similares de la palma *Euterpe edulis* (Conte *et al.*, 2003). Por la influencia de una incidencia de locus ligados todas las localidades, a excepción de Convento, se desvían significativamente del equilibrio de Hardy Weinberg, (Conte *et al.*, 2003). Una de las condiciones para que las localidades se encuentren en equilibrio, es que los locus sigan leyes de herencia mendeliana, pero al estar ligados y no segregarse independientemente rompen el equilibrio (Freeland, 2005).

7.2. Selección de heterocigotos

Al igual que en otras investigaciones de especies vegetales (Dick *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2005; Schaberg *et al.*, 2008) se espera que en especies exogámicas de larga vida como árboles tropicales, tengan una alta diversidad genética en general como lo evidencian los altos índices de heterocigocidad encontrados en *P. aequatorialis* que presenta valores mayores a 0.5, promedio de $H_e=0.627$ valores comparables a un análisis de microsatélites en la palma dioica *Phoenix dactylifera* que tiene $H_e=0.702$ (Hammadi *et al.*, 2011).

En poblaciones de palmas de las especies *Astrocaryum mexicanum* y *Euterpe edulis* se observó un mayor número de heterocigotos en semillas que en adultos y una correlación positiva entre crecimiento y heterocigocidad para adultos (Eguiarte *et al.*, 1992; Conte *et al.*, 2003). Este incremento de heterocigotos en semillas puede ser generado por una débil selección en semillas de individuos heterocigotos frente a homocigotos, reportado en varias especies de árboles (Eguiarte *et al.*, 1992; Conte *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2008).

Se encontraron valores positivos de diversidad alélica, entre localidades en promedio es $A=5$ alelos por población y entre *SSRs* fue de $A=8$ alelos por locus, correspondiendo a valores medianamente altos comparados a otros estudios donde se tienen en promedio 2-3 alelos por locus (Gaitán, 2003), 7.2 (Hammadi *et al.*, 2011), 11 (Billote *et al.*, 2004) y 14 (Conte *et al.*, 2008). En *P. aequatorialis* y en la mayoría de plantas, especialmente árboles tropicales, se muestran altos niveles de diversidad genética muy similares entre localidades, índice que puede ser generado por un activo flujo génico (Renau-Morata *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2003; Lowe *et al.*, 2005; Sezen *et al.*, 2007; Conte *et al.*, 2008; Karubian *et al.*, 2010; Dick *et al.*, 2008; Barfod *et al.*, 2011). La mayor diversidad genética en *P. aequatorialis*, como indica el AMOVA, es mantenida dentro de las localidades con un 96,87% de variación, como se espera para especies exogámicas predominantemente (González-Pérez *et al.*, 2004).

Los índices *F_{is}* presentaron valores bajos sugiriendo un activo flujo génico entre localidades, esto se observa también en la pendiente negativa del gráfico de aislamiento por distancia (Figura 6). La localidad de Santa Rosa posee un índice negativo *F_{is}*=-0.032 y la mayor heterocigosidad observada (*H_e*=0.702) de todas las localidades, esto puede ser debido a que solo el polen se mueve largas distancias y las semillas muy poco como sucede en *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte *et al.*, 1992). Es llamativo ya que los frutos de la tagua son grandes, los cuales no son fácilmente movilizados, adicionalmente los hábitats son degradados y muchos de ellos desprovistos de fauna local impidiendo definir que existan buenos dispersores. En este sentido, la dispersión podría aportar poco en la diversidad genética y por consiguiente la polinización jugará un rol clave en la dinámica de la diversidad de la tagua.

La inflorescencia en especies de *Phytelphas* es visitada por cientos de insectos, Barfod *et al.* (1987) identifico 6000 escarabajos estafilínidos, 3500 escarabajos curculionidos

(*Phyllotrox*) y 100 escarabajos nitidulidos (*Mystrops*) en *Phytelephas tenuicaulis* durante la antesis (Barfod *et al.*, 2011). Los altos valores de heterocigocidad y el patrón de alta diversidad genética de la tagua podría ser debido a la acción de su polinizador, que dispersa el polen a grandes distancias (Eguiarte *et al.*, 1992). Lo que sugiere que los insectos juegan un rol importante en la estructuración genética de las localidades de *P. aequatorialis*.

Cambios en la diversidad y diferenciación genética después de una disminución del tamaño poblacional toma generaciones en ser observada, lo que difiere en coeficientes de endogamia (Lowe *et al.*, 2005). El caso de la localidad El Mono, que posee el mayor valor de $F_{is} = 0.126$, supone un valor bajo de endogamia, comparado a una localidad alterada de *Swietenia humilis* que posee un valor de $F_{is} = 0.217$, un índice menor de $H_e = 0.526$ y que pese a la fragmentación severa ocurrida por más de 40 años, pudo permanecer como una meta localidad, manteniendo e incluso aumentando la diversidad genética de sus localidades alteradas (White *et al.*, 1999).

Debido a la alta diferenciación genética e índices negativos de endogamia encontrados en la tagua, la depresión endogámica puede tener efectos negativos en la resiliencia de las localidades (Lowe *et al.*, 2005). *Phytelephas aequatorialis* posee poca endogamia, la localidad de Convento ($F_{is} = 0.052$) se asemeja a la media de $F_{is} = 0.054$, siendo esta la que más equilibrio supone (desviación ns de HWE = 0.000). Presumiendo que las localidades de tagua poseen la capacidad genética para mantener su resiliencia, por lo que se debe evitar en estrategias de manejo números de localidades pequeñas. Las reservas ecológicas deben ser grandes para mantener la alta diversidad genética intrapoblacional, sin embargo no son necesarias muchas reservas naturales debido a que escasas y cercanas áreas protegidas pueden funcionar como pasillos o escalones que permitan el flujo génico entre sitios (Eguiarte *et al.*, 1993). Un alto flujo génico puede permitir una extensiva red de

intercambio de genes entre localidades generando altos niveles de diversidad genética (White *et al.*, 1999).

Los bajos índices de diferenciación genética (*Fst*) muestra una débil estructuración de la diversidad genética en *P. aequatorialis* (Lowe *et al.*, 2005; Conte *et al.*, 2008; Eguiarte *et al.*, 1992), a pesar de su corta distancia entre ellas las localidades Convento y Atahualpa poseen el mayor índice de diferenciación genética (0.106*; Tabla 5). Esto coincide en el PCoA de *Fst* (Figura 4) donde la localidad de Convento es la que más diferenciación presenta entre las localidades. Reflejando que la distancia no es una fuerza que afecta la estructuración genética en localidades de *P. aequatorialis*, posiblemente debido a que localidades con baja densidad poblacional están relacionadas con dispersión del polen de larga distancia (Silva *et al.*, 2008). El bajo grado de diferenciación genética en todo el rango de *P. aequatorialis*, refleja altos niveles de flujo génico por vectores relacionados a polinización a lo largo de su rango geográfico a pesar de sufrir degradación del hábitat (González-Pérez *et al.*, 2004).

7.3. Reclutamiento de nuevos individuos

La cosecha de semillas de tagua junto a la degradación del hábitat generan impacto en la estructura, el reclutamiento de nuevos individuos y limitan la regeneración natural de las localidades de tagua (Dick *et al.*, 2008; Montúfar y Brokamp, 2011). Las localidades de *P. aequatorialis* poseen ausencia de subadultos, está casi exclusivamente formada por individuos adultos. El crecimiento de juveniles al estado de subadulto es un cuello de botella poblacional, limitando el número de adultos. Fomentar el crecimiento de subadultos es crítico para asegurar la sustentabilidad de las localidades (Velásquez-Runk, 1995). La ausencia de regeneración natural refleja la poca viabilidad biológica de las localidades a

futuro. Patrones similares se observan en la estructura poblacional de *Attalea colenda* en áreas de pastizales y bosques secundarios de Manabí (Montúfar y Brokamp, 2011).

El proceso de reclutamiento puede ser el responsable del incremento de heterocigotos en la tagua, este incremento de la frecuencia de heterocigotos es favorable para el manejo y la reducción de valores F_{st} y F_{is} son positivos para la conservación *in situ* de la especie. Manteniendo un stock de individuos reproductivos con altos niveles de heterocigocidad se puede generar descendencia con una diversidad genética deseable, conservando la dinámica y la estructura de las localidades (Conte *et al.*, 2003). Es de importancia para la sustentabilidad de la cosecha de tagua que las localidades alberguen una apreciable diversidad genética, que está comprometida por la falta de regeneración. Se debe tener en cuenta su naturaleza dioica al conservar altos niveles de reclutamiento, ya que es importante mantener una suficiente localidad de hembras reproductivas para futuras cosechas, hasta disponer de marcadores genéticos que nos permitan identificar el sexo de las plantas.

7.4. Vegetación amenazada

Los remanentes de vegetación en el litoral ecuatoriano y en las estribaciones andinas occidentales albergan las últimas localidades de palmeras en esta región. Localidades de *P. aequatorialis* aún mantienen la conectividad debido a su proximidad, beneficio que brindan las localidades no intervenidas de alrededor a las localidades intervenidas que reciben su influencia (Conte *et al.*, 2008; Lowe *et al.*, 2005).

Las localidades silvestres de palmeras están amenazadas por la transformación de bosques en tierras agropecuarias, degradación del hábitat y el extractivismo destructivo que puede desaparecer una parte importante de la base genética (Montúfar y Brokamp, 2011). La

diversidad genotípica y fenotípica constituye la materia prima para la domesticación y el mejoramiento genético de las especies vegetales promisorias como la tagua.

7.5. Impacto de la degradación de los bosques en la fauna local

La dispersión de la mayoría de semillas de bosques tropicales dependen de animales (Dick *et al.*, 2008), de igual manera que los polinizadores los cuales deben ser considerados como factor de estudio cuando una localidad está siendo intervenida. Éstos son quienes pueden mantener una reproducción cruzada entre individuos para evitar factores de endogamia y subsecuente reducción de la resiliencia de la localidad (Barfod *et al.*, 2011; Dick *et al.*, 2008). Es importante para la resiliencia de las localidades de tagua realizar estrategias de conservación dirigidas también a la fauna, por ello se sugiere realizar un estudio más específico de los agentes dispersores y polinizadores que influyen en la biología reproductiva de *P. aequatorialis*. Numerosos estudios comparativos proveen muchas ideas donde se ven relaciones co-evolutivas complejas y dinámicas entre las palmas y sus agentes polinizadores (Aguirre y Dirzo, 2008; Anderson *et al.*, 1988; Barfod *et al.*, 2011; Henderson, 2002).

Si suficiente polen llega a un árbol aislado para fertilizar todos sus potenciales óvulos, una reducción en la diversidad de la nube de polen por fragmentación de los bosques de Manabí, disminuye el número de donantes de polen. Pudiendo reducir la resiliencia de las localidades de tagua permitiendo reproducción entre individuos relacionados o padres inadaptados (Lowe *et al.*, 2005). El estudio revela la importancia de añadir ambos datos ecológicos y genéticos para permitir el mejor entendimiento de los procesos evolutivos y mejorar la eficacia del manejo de bosques, proyectos de reforestación y conservación de las especies (Gonçalves y de Carvalho, 2009).

Estrategias de conservación *ex situ*, basadas en semillas, colección de germoplasma, preservación de bancos de genes, jardines botánicos, entre otros, poseen poco valor práctico para conservar la diversidad genética dado al alto número de semillas y parientes que se necesita ser colectado para conservar al menos una parte de la diversidad genética de la localidad. Solo estrategias de conservación *in situ* parece ser de real valor para la conservación de especies que presenten este tipo de valores (Eguiarte *et al.*, 1993), ya que se pueden tomar en cuenta factores de polinización para mantener el flujo génico que promueve la sobrevivencia de las localidades.

7.6. Implicaciones para el manejo y conservación

La tagua presenta un alto nivel de resiliencia y un alto flujo génico, a pesar de la degradación de los ambientes antrópicos altamente fragmentados donde los individuos fueron colectados. El estudio realizado provee soporte para el manejo y estrategias de conservación de la especie, refleja potencial para un futuro manejo. Se sugiere que las localidades silvestres de tagua, que actualmente son cada vez más escasas, sean protegidas dentro del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) con el objetivo de proteger la base genética y los procesos ecológicos como es la actividad de sus dispersores y polinizadores.

Se propone que localidades de tagua presentes en pastizales y bosques secundarios sean utilizados como sistemas de explotación de tagua, incluyendo programas de mejoramiento con movilidad de pool génico de localidades que posean alta diversidad genética. Esto es importante tomando en cuenta que *P. aequatorialis* es una especie endémica y poblacionalmente limitada.

Son múltiples los factores que pueden explicar la diversidad genética existente en un medio altamente fragmentado tales como el efecto de polinización, dispersión y efectos

antropogénicos. Estos factores influyen a la resiliencia de las localidades, lo que sugiere realizar futuros estudios de polinización, dispersión de semillas, ecología de la fauna y cultivo de tagua. Es prioritario entender las relaciones independientes de flujo génico tanto en polinizadores como en dispersores, considerando que la disminución de localidades de animales puede afectar en gran capacidad la riqueza de la diversidad genética.

Lamentablemente esta información es deficiente en las regiones neotropicales y ha permitido que no se valore el recurso en función de nuevas técnicas, en particular las genéticas donde se pueden evidenciar los efectos inmediatos de factores que afectan a las localidades. Se promueve seguir realizando estudios que permitan enriquecer con más marcadores moleculares, información que tiene un papel importante en la incidencia política en la toma de decisiones para la conservación de la tagua a nivel regional.

Se sugiere catalogar a *Phytelephas aequatorialis* en la lista roja de especies como vulnerable debido a la creciente sobreexplotación del recurso, falta de regeneración, incremento de la degradación de los bosques naturales por crecimiento poblacional y debido a la necesidad de planes de conservación de los remanentes.

8. LITERATURA CITADA

- Acosta-Solís, M. 1944. La Tagua. Quito. Instituto Ecuatoriano de Ciencias Naturales.
- Acosta-Solís, M. 1948. Tagua or Vegetable Ivory: A Forest Product of Ecuador. *Economic Botany* 2: 46-57.
- Aguirre, A., Dirzo, R. 2008. Effects of fragmentation on pollinator abundance and fruit set of an abundant understory palm in a Mexican tropical forest. *Biological Conservation* 141: 375-384.
- Anderson, A.B., Overal, B., Henderson, A. 1988. Pollination ecology of a forest dominant palm (*Orbignya phalerata* Mart.) in Northern Brazil. *Biotropica* 20: 192-205.
- Bakoumé, C., Wichneswari, R., Rajanaidu, N., Kushairi, A., Amblard, P. y Billote, N. 2007. Allelic diversity of natural oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) populations detected by microsatellite markers: implications for conservation. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 5: 104-107.
- Barfod, A.S., Hagen, M., Borchsenius, F. 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Annals of Botany* 108: 1503-1516.
- Bernal, R., Ervik, F. 1996. Floral Biology and Pollination of the Dioecious Palm *Phytelephas seemannii* in Colombia: An adaptation to Staphylinid Beetles. *Biotropica* 28 (4b): 682-696.
- Billote, N., Couvreur, T., Marseillac, N., Brottier, P., Perthuis, B., Vallejo, M., Noyer, L., Jacquemoud-Collet, P., Risterucci, M. y Pintaud, C. 2004. 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.

Borchsenius, F., Moraes, M. 2006. Diversidad y usos de palmeras andinas (Arecaceae). En: *Botánica Económica de los Andes Centrales* (M. Moraes, B. Ollgaard, L.P. Kvist, F. Borchsenius y H. Balslev, eds) pp. 412-433. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz.

Borchsenius, F., Borgtoft-Pedersen, H., Balslev, H. 1998. Manual of the Palms of Ecuador. AAU Reports 37. Department of Systematic Botany, University of Aarhus, Denmark, in collaboration with Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Borgtoft-Pedersen, H. 1993. Extractivism in Ecuador with special emphasis on management and economic exploitation of native palms (Arecaceae). Tesis de Ph.D. Aarhus University, Denmark.

Borgtoft-Pedersen, H., Skov, F. 2001. Mapping Palm Extractivism in Ecuador Using Pair-Wise Comparisons and Bioclimatic Modeling. *Economic Botany* 55 (1): 63-71.

Brokamp, G., Borgtoft-Pedersen, H., Montúfar, R., Jácome, J., Weigend, M. y Balslev, H. 2014. Productivity and management of *Phytelephas aequatorialis* (Arecaceae) in Ecuador. *Annals of Applied Biology* 164: 257–269.

Brokamp, G., Montúfar, R., Jácome, J. En preparación. A case study on commercialization of *Phytelephas aequatorialis* in Ecuador.

Conte, R., Nodari, R.O., Vencovsky, R. y Sedrez dos Reis, M. 2003. Genetic diversity and recruitment of the tropical palm, *Euterpe edulis* Mart., in a natural population from the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 91: 401-406.

- Conte, R., Sedrez dos Reis, M., Mantovani, A. y Vencovsky, R. 2008. Genetic Structure and Mating System of *Euterpe edulis* Mart. Populations: A comparative analysis using microsatellite and allozyme markers. *Heredity* 99 (5): 476-482.
- Cruse-Sanders, J., Hamrick, J.L. 2004. Genetic Diversity in Harvested and Protected Populations of Wild American Ginseng, *Panax quinquefolius* L (Araliaceae). *American Journal of Botany* 91: 540-548.
- Dayanandan, S., Bawa, K., Kesseli, R. 1997. Conservation of microsatellites among tropical trees (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84 (12): 1658-1663.
- Dick, C.W., Hardy, O.J., Jones, F.A. y Petit, R.J. 2008. Spatial Scales of Pollen and Seed-Mediated Gene Flow in Tropical Rain Forest Trees. *Tropical Plant Biology* 1: 20-33.
- Doyle, J.J., Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Eguiarte, L.E., Búrquez, A., Rodríguez, J., Martínez-Ramos, M., Sarukhán, J. y Piñero, D. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* 47: 75-87.
- Eguiarte, L.E., Perez-Nasser, N., Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Elshibli, S., Korpelainen, H. 2008. Excess heterozygosity and scarce genetic differentiation in the populations of *Phoenix dactylifera* L: Human impact or ecological determinants. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization* 7 (2): 95-104.
- Ervik, F., Tollsten, L., Knudsen, J.T. 1999. Floral scent chemistry and pollination ecology in phytelephantoid palms (Arecaceae). *Plant Systematics and Evolution* 217: 279-297.

Escudero, A., Iriondo, J. M., Torres, M. E. 2003. Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. *Biology Conservation* 113: 351-365.

Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester, UK.

Gaiotto, F.A., Grattapaglia, D., Vencovsky, R. 2003. Genetic Structure, Mating System, and Long-Distance Gene Flow in Heart of Palm (*Euterpe edulis* Mart.). *Heredity* 94: 399-406.

Gaitán, E., Martínez, A., Duque, M., Bernal, R., Tohme, J. y Samper, C. 2003. Uso de técnicas moleculares para estudios de diversidad y conservación de palmas colombianas en vía de extinción. Tesis de doctorado. Instituto Alexander Von Humboldt, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

Gonçalves, A., de Carvalho, D. 2009. What the reasons for no inbreeding and high genetic diversity of the neotropical fig tree *Ficus arpazusa*?. *Conservation Genetics* 10: 1789-1793.

González-Pérez, M.A. Caujapé-Castells, J., Sosa, P.A. 2004. Allozyme variation and structure of the Canarian endemic palm tree *Phoenix canariensis* (Arecaceae): implications for conservation. *Heredity* 93: 307-315.

Guo, S.W., Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.

- Hammadi, H., Vendramin, G.G., Ali, F. 2011. Microsatellite diversity among tunisian date palm (*Phoenix dactylifera* L.) subpopulations. *Pakistan Journal of Botany* 43 (2): 1257-1264.
- Hardane, J.B.S. 1954. An exact test for randomness of mating. *Genetics* 52: 631-635.
- Hardy, H.G. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28: 49-50.
- Henderson, A. 2002. Evolution and ecology of palms. New York Botanical Garden Press, New York.
- Hernández, J.A., Mora, J., Rocha, O. 2008. Diversidad genética y relaciones de parentesco de las localidades silvestres y cultivadas de pejibaye (*Bactris gasipaes* Palmae), utilizando marcadores microsatelitales. *Revista de Biología Tropical* 56 (1): 217-245.
- Holling, C.S. 1973. Resilience and Stability of Ecological Systems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 4:1-23
- Jácome, J.M. 2013. Estructura poblacional, productividad y fenología floral de *Phytelephas aequatorialis* (tagua) en la costa ecuatoriana. Tesis de Licenciatura, Carrera de Ciencias Biológicas. PUCE. Quito. 109 p.
- Jensen, J.L., Bohonak, A.J., Kelley, S.T. 2005. Isolation by distance, web service. *Genetics* 6: 13.
- Jolliffe, I.T. 2002. Principal Component Analysis. Segunda edición. Springer-Verlag, New York.
- Jost, L. 2008. GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17: 4015-4026.

Karubian, J., Sork, V.L., Roorda, T., Duraes, R. y Smith, T.B. 2010. Destination-based seed dispersal homogenizes genetic structure of a tropical palm. *Molecular Ecology* 19: 1745-1753.

Koziol, M.J., Borgtoft-Pedersen, H. 1993. *Phytelephas aequatorialis* (Arecaceae) in Human and Animal Nutrition. *Economic Botany* 47 (4): 401-407.

Loveless, M. D., Hamrick. J. L. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.

Lowe, A.J., Boshier, D., Ward, D., Bacles, C.F.E. 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.

Lowe, A., Harris, S., Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: design, analysis and application*. Blackwell Publishing, Estados Unidos.

Montúfar, R. 2011. Arecaceae. En: Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador (S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa y H. Navarrete, eds) pp. 128-132. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

Montúfar, R. 2013. La tagua de la gloria al olvido. *Nuestra Ciencia* 15: 77-81.

Montúfar, R., Anthelme, F., Pintaud, J-C. y Balslev, H. 2011. Disturbance and Resilience in Tropical American Palm Populations and Communities. *Botanical Review* 77: 426-461.

DOI 10.1007/s12229-011-9085-9

Montúfar, R., Barreiro, J.M. 2010. Estructuración genética de localidades de palmeras en el neotrópico derivado de marcadores microsatélites (SSRs). *Ecología en Bolivia* 45 (3): 30-43.

Montúfar, R., Brokamp, G. 2011. Palmeras aceiteras del Ecuador: estado del arte en la investigación de nuevos recursos oleaginosos provenientes del bosque tropical. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Ecología y Genética. *Revista ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas* 32 (1-2): 95-118.

Montúfar, R., Brokamp, G., Jácome, J. 2013. Tagua. *Phytelephas aequatorialis*. En: *Palmas Ecuatorianas: biología y uso sostenible* (R. Valencia, R. Montúfar, H. Navarrete, y H. Balslev, eds) pp. 187-201. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. ISBN: 978-9942-13-263-5.

Montúfar, R. y Pitman, N. 2003. *Phytelephas aequatorialis*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 11 February 2015.

Mustajarvi, K., Siikamaki, P., Rytönen, S. y Lammi, A. 2001. Consequences of Plant Population Size and Density for Plant-Pollinator Interactions and Plant Performance. *Journal of Ecology* 89 (1): 80-87.

Namoff, S., Veloz, A., Jiménez, F., Rodríguez-Peña, R., Peguero, B., Lewis, C., Moynihan, J., Abdo, M., Maunder, M., Wettberg, E.V., Meerow, A., Griffith, P.M. y Francisco-Ortega, J. 2011. Sweet Drinks are Made of This: Conservation Genetics of an Endemic Palm Species from the Dominican Republic. *Heredity* 102 (1): 1–10. doi:10.1093/jhered/esq118.

Nei, M. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals Human Genetics* 41: 225-233.

Nei, M Y Chesser, R.K. 1983. Estimation of fixation indexes and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47: 253-259.

Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, Estados Unidos.

Peakall, R., Smouse, P.E. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.

Peakall, R. y Smouse, P.E. 2006. GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology* 6: 288-295.

Perera, L., Russell, J.R., Provan, J. y Powell, W. 2001. Levels and distribution of genetic diversity of coconut (*Cocos nucifera* L, var. *Typica form typica*) from Sri Lanka assessed by microsatellite markers. *Euphytica* 122: 381-389.

Purcell, S., Daly, M.J., Sham, P.C. 2007. WHAP: haplotype-based association analysis. *Bioinformatics* 23: 255–256.

Radosavljevic, I., Satovic, Z., Jakse, J., Javornik, B., Greguras, D., Jug-Dujakovic, M. y Liber, Z. 2012. Development of New Microsatellite Markers for *Salvia officinalis* L and Its Potential Use in Conservation-Genetic Studies of Narrow Endemic *Salvia brachyodon* Vandas. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 12082-12093. doi:10.3390/ijms130912082

Raymond, M., Rousset, F. 1995a. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.

- Renau-Morata, B., Nebauer, S.G., Sales, E., Allainguillaume, J., Caligari, P. y Segura, J. 2005. Genetic diversity and structure of natural and managed populations of *Cedrus atlántica* (Pinaceae) assessed using random amplified polymorphic DNA. *American Journal of Botany* 92 (5): 875-884.
- Robertson, A., Hill, W. G. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.
- Sanín, M., Galeano, G. 2011. A revision of the Andean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). *Phytotaxa* 34: 1-64.
- Schaberg, P.G., Dehayes, D.H., Hawley, G.J. y Nijensohn, S.E. 2008. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management* 256: 855-862.
- Schwartz, M.K., Luikart, G., Waples, R.S. 2006. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (1): 25-33.
- Sezen, U.U., Chazdon, R.L., Holsinger, K.E. 2007. Multigenerational genetic analysis of tropical secondary regeneration in a canopy palm. *Ecological Society of America. Ecology* 88 (12): 3065-3075.
- Sierra, R. 1999a. Propuesta preliminar de un sistema de clasificación de vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF-BIRG y EcoCiencia: 194.
- Sierra, R. 1999b. Vegetación Remanente del Ecuador Continental. Map Scale 1:1 000 000. Proyecto Inefan/GEF and Wildlife Conservation Society, Quito.
- Silva, M.B., Kanashiro, M., Ciampi, A.Y., Thompson, I. y Sebben, A.M. 2008. Genetic effects of selective logging and pollen gene flow in a low-density population of the

dioecious tropical tree *Bagassa guianensis* in the Brazilian Amazon. *Forest Ecology and Management* 255: 1548-1558.

Siong Ng, K.K., Lee, S.L., Saw, L.G., Plotkin, J.B. y K, C.L. 2006. Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. *Tree Genetics & Genomes* 2: 121-131.

Siong, K. K., Leong, S.L. 2006. Spatial structure and genetic diversity of three tropical tree species with different habitat preferences within a natural forest. *Tree Genetics & Genomes* 2: 121-131.

Soldati, C.M., Fornes, L.Z., Thomas, E. y Zelener, N. 2013. An assesment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology* 47: 45-55.

Trisha, C.K., Godfrey B.R. 2001. Pollination and breeding system of a neotropical palm *Astrocaryum vulgare* in Guyana: a test of the predictability of syndromes. *Journal of Tropical Ecology* 17: 577-592. doi:10.1017/S0266467401001432.

Velásquez-Runk, J. 1995. Tagua Nut Extraction from a National Park Buffer Zone: Evaluating Management Strategies. Meeting of the Latin American Studies Association, The Sheraton, September 28-30. Washington, U.S.A.

Velásquez-Runk, J. 1998. Productivity and Sustainability of a Vegetable Ivory Palm (*Phytelephas aequatorialis*, Arecaceae) under Three Management Regimes in Northwestern Ecuador. *Economy Botany* 52: 168-182.

Weinberg, W. 1908. On the demonstration of heredity in man. *Papers on human genetics* (S.H. Boyer Ed) Prentice Hall, Englewood Cliffs, New York, U. S. A.

- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Weir, B. S., Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- White, G.M., Boshier, D.H. y Powell, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8: 1899-1909.
- Whitlock, M. 2011. $G'ST$ and D do not replace FST . *Molecular Ecology* 20(6): 1083-1091.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.

9. FIGURAS



FIGURA 1: Estipula cortada para toma de muestra, foto de *Phytelephas aequatorialis*.



FIGURA 2: Izq. superior: semilla de tagua, Izq. inferior: proyecciones cónicas de la infrutescencia de un individuo femenino, Der. superior: inflorescencia masculina, Der. inferior: infrutescencias en la base de las hojas.

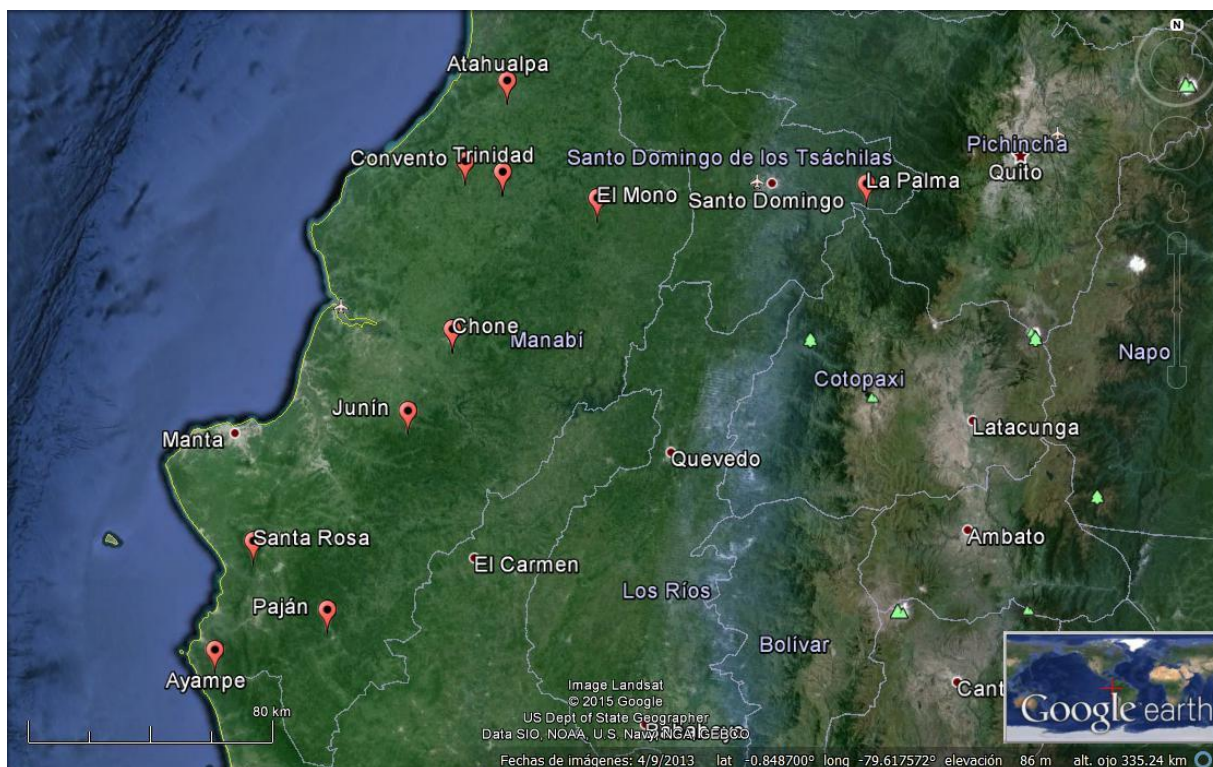


FIGURA 3. Ubicación de los sitios de colección de *P. aequatorialis* (obtenida del programa Google Earth).

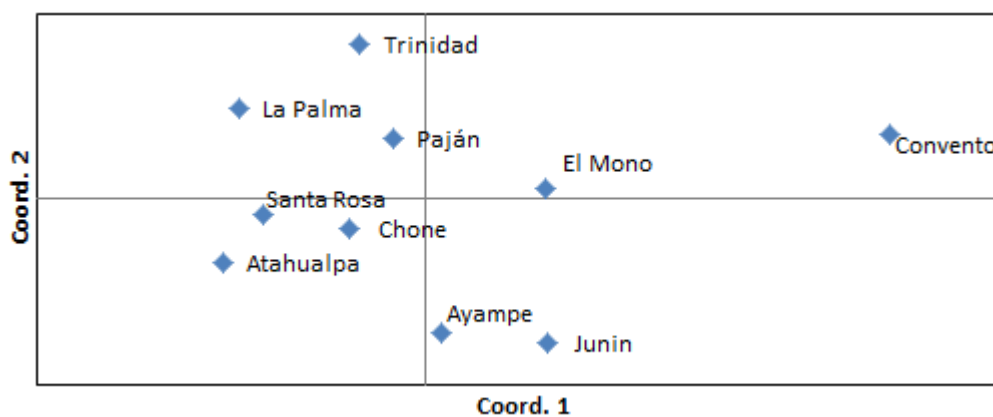


FIGURA 4. PCoA realizado con la matriz de *Fst* obtenida en Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) entre 10 localidades de *P. aequatorialis*, generado con el programa GenAlex. Porcentaje de la variación en la primera coordenada: 40,13%; porcentaje de variación en la segunda coordenada: 25,97%, porcentaje de variación en la tercera coordenada: 20,34%.

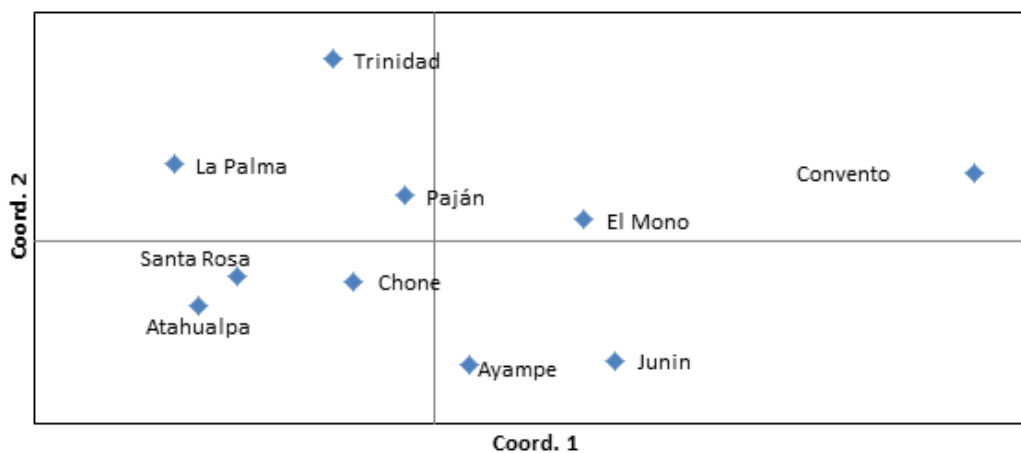


FIGURA 5. PCoA realizado con la matriz de D (Jost, 2008) entre 10 localidades de *P. aequatorialis* obtenido con el programa GenAlEx. Porcentaje de variación en la primera coordenada: 37.35 %; porcentaje de variación en la segunda coordenada: 28.18 %. Porcentaje de variación en la tercera coordenada: 19,69%

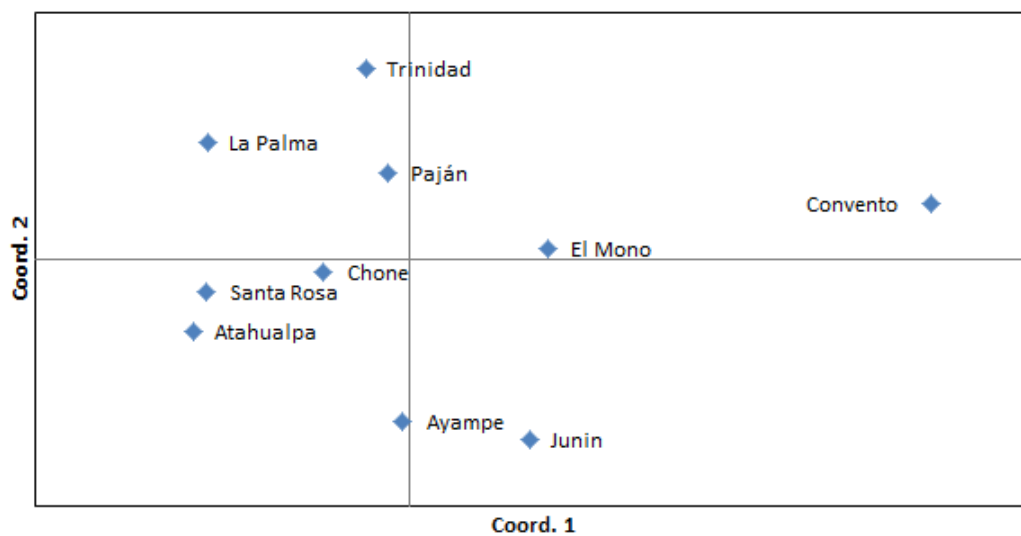


FIGURA 6. PCoA realizado con la matriz de G (Nei) entre 10 localidades de *P. aequatorialis* obtenido con el programa GenAlEx. Porcentaje de variación en la primera coordenada: 40.42 %; porcentaje de variación en la segunda coordenada: 26.15 %. Porcentaje de variación en la tercera coordenada: 18,77%.

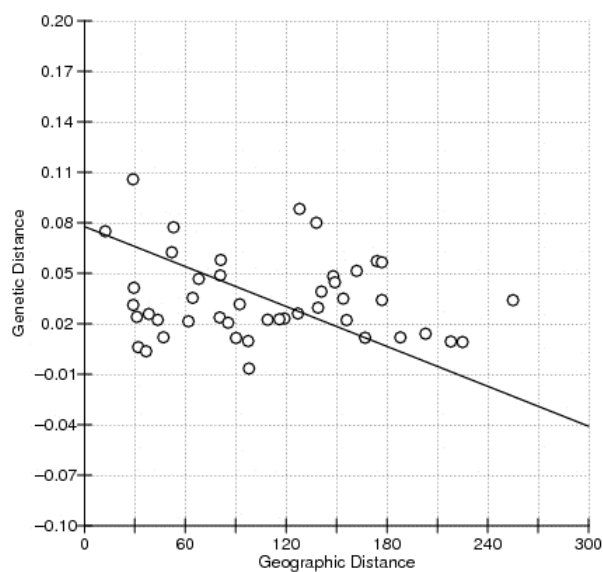


FIGURA 7. Gráfico de aislamiento por distancia obtenido con el programa Isolation by Distance Web Service, utilizando una matriz de distancias geográficas y una de diferenciación genética con el estadístico F_{st} obtenido con el programa GenAlEx. Cada punto representa la distancia geográfica y la genética de cada par de localidades de *P. aequatorialis* ($r = -0.1441$; $R^2 = 0.0208$; $p = 0.2410$).



FIGURA 8. Gráfico de porcentajes de variación molecular (AMOVA). Obtenido con el programa GenAlEx

10. TABLAS

Tabla 1. Descripción general de las localidades muestreadas para *Phytelephas aequatorialis*.

Localidad	N	Latitud	Longitud	Tipo de vegetación
Atahualpa	11	-0.027833°	-79.928863°	Bosque semidecidual
La Palma	15	-0.324396°	-78.904061°	Bosque tropical montano bajo
Convento	12	-0.258886°	-80.048550°	Bosque semidecidual
Trinidad	12	-0.289364°	-79.941579°	Bosque semidecidual
El Mono	16	-0.364409°	-79.671276°	Bosque semidecidual
Chone	39	-0.738426°	-80.085044°	Bosque siempre verde estacional piemontano
Junín	17	-0.971527°	-80.212371°	Bosque siempre verde estacional montano
Santa Rosa	12	-1.344028°	-80.656450°	Bosque seco
Paján	23	-1.540766°	-80.444768°	Bosque seco
Ayampe	35	-1.657133°	-80.769581°	Bosque de garúa
N total	192			

Tabla 2. Valores *p* del análisis de desequilibrio ligado para cada par de locus en todas las localidades (método de Slatkin, M. 1994a) de *P. aequatorialis* obtenidos con el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

	Cs24	Ca11	Ca13	Ca30	Ca17	Cs30	Cs9
Cs24	0						
Ca11	0,000*	0					
Ca13	0,010*	0,000*	0				
Ca30	0,140	0,000*	0,554	0			
Ca17	0,000*	0,000*	0,095*	0,017*	0		
Cs30	0,008*	0,207	0,165	0,682	0,056	0	
Cs9	0,003*	0,000*	0,445	0,000*	0,223	0,240	0

Tabla 3. Resumen de los resultados de diversidad genética de *P. aequatorialis* de todas las localidades obtenidos con los programas Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005) y HWE con Genepop (Raymond y Rousset, 1995a).

n=número de alelos, *Fis*=índice de endogamia, *A*=Diversidad alélica, *Ho*=Heterocigosidad observada, *He*= Heterocigosidad esperada, *AU*=Alelos únicos y *HWE*=Equilibrio de Hardy Weinberg).

Localidades	<i>n</i>	<i>Fis</i>	<i>A</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>AU</i>	<i>HWE</i>
Atahualpa	11	0,123	5.375	0,592	0,672	0	***
La Palma	15	0,006	4.625	0,673	0,681	0	***
Convento	12	0,052	4.125	0,552	0,581	0	Ns
Trinidad	12	0,008	5.125	0,698	0,703	0	***
El Mono	16	0,126	5.625	0,609	0,695	0	***
Chone	39	0,087	6.000	0,597	0,658	0	***
Junín	17	0,045	4.875	0,625	0,654	0	***
Santa Rosa	12	-0,032	4.714	0,702	0,715	0	***
Paján	23	0,027	5.625	0,625	0,642	0	***
Ayampe	35	0,100	6.250	0,595	0,664	0	***
Media		0,054	5,234	0,627	0,666		
Desviación estándar		0,054	0,663	0,049	0,034		
Coefficiente de variación		0,987	0,127	0,079	0,051		

Tabla 4. Composición genética por locus de *P. aequatorialis* obtenidos con el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005), HWE obtenido con GenePop (Raymond y Rousset, 1995a) (n =número de alelos, F_{is} =índice de endogamia, A =Diversidad alélica, H_o =Heterocigosidad observada, H_e = Heterocigosidad esperada, AU =Alelos únicos, HWE =Equilibrio de Hardy Weinberg).

Marcadores	<i>N</i>	<i>F_{is}</i>	<i>A</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>AU</i>	<i>HWE</i>
Cs24	192	-0,061	11	0,823	0,795	0	***
Ca11	192	-0,226	9	0,922	0,784	0	***
Ca13	192	0,254	7	0,516	0,717	0	***
Ca30	185	-0,258	6	0,832	0,678	0	***
Ca17	192	0,239	12	0,641	0,854	0	***
Cs30	192	0,691	5	0,214	0,714	0	***
Cs9	185	-0,259	6	0,838	0,665	0	***
Media		0,054	8	0,684	0,744		
Desviación estándar		0,358	2,708	0,249	0,069		
Coefficiente de variación		6,586	0,339	0,364	0,093		

Tabla 6. AMOVA de las localidades de *P. aequatorialis* calculado en el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

Fuente de Variación	Grados de Libertad	suma de cuadrados	componentes de variancia	Porcentaje de variación
Entre localidades	9	51,442	0,084	3,130
Dentro localidades	374	968,438	2,589	96,870
Total	383	1019,880	2,673	

Tabla 7. AMOVA de individuos de *P. aequatorialis* calculado en el programa Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005).

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación
Entre individuos	191	553.880	0.23641	8.88
Dentro individuos	192	466.000	2.42708	91.12
Total	383	1019.880	2.66349	

11. ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN manual (Doyle y Doyle modificado)

1. En los tubos con material triturado (0.05g), se añadió 900ul CTAB previamente calentado a 65 °C y se homogeneizó con la ayuda de un vórtex.
2. Se añadió 1.1ul de beta mercaptoetanol y se incubó a 37 °C, vortexeando las muestras en intervalos de tiempo hasta completar 60 minutos.
3. Se centrifugó la mezcla por 10 minutos y se retiró el sobrenadante contabilizando la cantidad recuperada, se colocó alcohol isoamílico (24:1) en relación a la cantidad recuperada, se mezcló vigorosamente las solución durante 5 minutos.
4. Se centrifugó la solución durante 10 minutos y se observó dos fases claramente definidas, se recuperó la mayor volumen posible de la fase acuosa que generalmente es más clara, contabilizando la cantidad recuperada y se tuvo cuidado de no romper las fases.
5. Se colocó igual volumen que el recuperado, de cloroformo isoamílico (24:1) para realizar un segundo lavado, se mezcló durante 5 minutos, se centrifugó durante 7 minutos para que se formen las dos fases nuevamente. Se recuperó el volumen de la primera fase.
5. Se colocó 2/3 de isopropanol frío, en relación en volumen recuperado y se dejó precipitar toda la noche.
6. Al día siguiente se centrifugó durante 10 minutos la solución, y se observó la presencia de un pelet, se descartó el isopropanol con cuidado de no perder el pelet.
7. Finalmente se realizó 2 lavados con etanol al 70% durante 10 minutos cada uno y se dejó secar, una vez seco se resuspendió con 100ul de buffer Elución y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se almacenó la solución.

Anexo 2. Información de 7 locus microsatélites utilizados en amplificación cruzada con *P. aequatorialis*. (Gaitán *et al.*, 2003).

	Cebador	Repetición	Rango amplificación (pb)
Cs9	Cs9	(GA)9(TAA)3	137-143
Cs24	Cs24	(CA)20(GA)5	285-296
Cs30	Cs30	(GA)15	152-157
Ca11	Ca11	(CT)10(GT)8	174
Ca13	Ca13	(GA)22	256
Ca17	Ca17	(GA)30	120-130
Ca30	Ca30	(GT)10(GT)14	120-130

Anexo 3. Primers polimórficos utilizados en *P. aequatorialis* con su respectivo protocolo PCR.

Cs24	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 Mm	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 50°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Ca11	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 50°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Ca13	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 52°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Ca30	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 52°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Ca17	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 50°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Cs30	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	35 ciclos
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
F	0,1 uM	0,15ul	Anillamiento: 15 segundos a 52°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Cs9	F	1 Reacción	Protocolo PCR
Buffer 5x	1X	3ul	Denaturación inicial: 4 minutos a 94°C
Mg	2,5 mM	1,5ul	Denaturación: 15 segundos a 94°C
dNTPs	0,25 mM	0,375ul	Anillamiento: 15 segundos a 50°C
F	0,1 uM	0,15ul	Elongación: 15 segundos a 72°C
R	0,1 uM	0,15ul	Elongación final: 5 minutos a 72°C
Taq	1U/ul	0,2ul	*35 ciclos
ADN		3ul	
H2O		6,625 ul	
Total	15ul	15 ul	

Anexo 4. Proceso estandarizado de electroforesis en gel de acrilamida, preparación de geles y corrida de PCR.

Preparación gel de agarosa al 1%

Colocar la cámara de agarosa lavada y secada con su respectiva base plástica transparente donde se pondrá el gel en una mesa, tener a un lado listos los pocillos que se van a utilizar.

Pesar en la balanza 1 gr de agarosa, en un tubo Erlenmeyer colocar la agarosa, en una probeta colocar 100 ml de agua pura, colocar el agua en el tubo Erlenmeyer y agitar.

Una vez agitados calentar en el microondas por 40 segundos, utilizando guantes para el calor, sacar el frasco del microondas, rápidamente agitar fuertemente con la mano y volver a calentar en el microondas por 40 segundos más. Sacar y observar que no existan grumos de agarosa, observar que este bien mesclado la agarosa con el agua, de ser necesario agitar y calentar unos 15 segundos más.

Una vez bien mezclado la agarosa con el agua, enfriar el Erlenmeyer en un chorro de agua, sentir en la mano que el calor sea soportable y colocar 5ul de bromuro de etidio. Agitar circularmente suavemente para evitar la formación de burbujas hasta que el rojo del bromuro se haya disuelto completamente en toda la agarosa. Verificar que la solución no esté muy caliente para poder colocarla en la cámara de agarosa a fin de que pueda moverse y ocupar toda la cámara sin evaporarse la agarosa.

Eliminar con una punta las burbujas que estén presentes en el gel, moviéndolas a las esquinas de la cámara o reventarlas, colocar los pocillos en la cámara pensando en cómo va a correr las muestras. Dejar secar por unos 20 minutos. Retirar los pocillos, colocarlo en la cámara de electroforesis con la base plástica transparente.

Para la preparación de geles de agarosa al 3% es el mismo procedimiento pero se pesan 3 gramos de agarosa, tomará más agitación y más tiempo en el microondas hasta que se disuelva completamente. Se toman intervalos de tiempo en el microondas ya que si se deja en un solo tiempo la agarosa reaccionara con el agua y rebosara el tubo Erlenmeyer regando la solución en el microondas, por ello es necesario hacerlo con intervalos de tiempo y agitándolo para que se disuelva de mejor manera la agarosa y no reaccione.

Preparación gel de acrilamida cámara grande, vidrios largos.

Colocar en la mesa de preparación de geles de acrilamida el plástico de base en el espacio donde se prepararan el gel sujetando los extremos con pedazos de masquin. Colocar sobre la mesa con el plástico los soportes de espuma Flex para el vidrio atrayente y vidrio repelente en total 4 soportes de espuma flex. Colocar los vidrios observando que la marca del vidrio este hacia arriba. Sobre el vidrio repelente colocar 1,5 ml de rainx con una pipeta de 1 ml, colocando 7,5ml + 7,5ml formando una x al colocarlo en el vidrio, con un papel absorbente doblado en forma de cuadrado esparcir el rainx sobre todo el vidrio moviendo el papel en dirección derecha izquierda abajo derecha izquierda abajo... Hasta cubrir todo el vidrio, en el timer poner a contabilizar 10 minutos.

Para el vidrio atrayente previamente preparar la solución en un tubo de 2ml, colocar 1ml de etanol 100%, 5ul de ácido acético más 3ul de bindsilane, vortexear. Colocar la solución en el vidrio atrayente formando una línea esparcida a lo ancho del vidrio, con un papel doblado en forma de cuadrado esparcir la solución atrayente sobre todo el vidrio sin presionar mucho el papel sobre el vidrio en dirección derecha, abajo, izquierda, abajo, derecha, abajo, izquierda, abajo,... Sin dejar ni un solo espacio sin que haya pasado el papel con el atrayente. Dejar secar.

Preparar en un vaso de precipitación el gel con un agitador, medir en una probeta de 100ml 80ml de solución de acrilamida, colocarla en el vaso en agitación, colocar 50ul de temed en el vaso con la acrilamida.

Una vez pasados los 10 min de los vidrios, con el otro lado del papel utilizado en el gel repelente rociarle alcohol y limpiar rápida y suavemente los residuos de rainx, pasando el papel por todo el vidrio, al igual en el atrayente con el mismo papel utilizado, con el otro lado rociarle de alcohol y limpiar rápidamente el vidrio. Colocar los separadores de los bordes, poner encima el vidrio repelente sobre el atrayente, presionar los bordes donde están los separadores con unos 4 o 5 sujetadores en cada extremo, colocar en la base cinta adhesiva de forma que cubra toda la base sujetando los dos vidrios para evitar que al colocar la acrilamida se riegue por la base la solución. Sujetar los extremos donde quedo colocado la cinta adhesiva. Una vez sujetos los vidrios, colocar en la solución en agitación de la acrilamida 500ul de PSA, agitar por unos 5 segundos más.

Colocar desde un extremo del vidrio suavemente la acrilamida, observando que sea continua la colocación de la acrilamida en el vidrio observando que no queden burbujas, intentar que primero se complete todo el lado del que se inicia poniendo la acrilamida, sin mover el lugar de donde se inició poniendo la acrilamida completar el llenado del vidrio en su totalidad.

Soltar los soportes de los extremos superiores donde se colocará el peine, colocar el peine del borde que no tiene pocillos insertándolo hasta unos 0,8cm (esto es relativo ya que se debe observar hasta donde entrará el peine del lado de los pocillos a fin de que quede un pequeño espacio para poner la muestra al correr el gel), sujetar nuevamente los bordes donde se colocó el peine. Dejar secar.

En el vaso de precipitación tal vez sobre acrilamida, sellarlo con un pedazo de aluminio y observar hasta que polimerice la acrilamida.

Una vez seca la acrilamida, retirar el peine suavemente sin dañar el gel, limpiar el frente de carga los residuos de acrilamida que hayan quedado con el borde del peine y agua, con papel absorbente limpiar el frente de carga completamente sin que quede ningún residuo, colocar el peine del lado de los pocillos hasta que las puntas del peine toquen el gel sin introducirlo. Retirar la cinta adhesiva, llevar los vidrios juntos a la cámara en forma horizontal, colocar la base en la cámara, retirar los sujetadores rápidamente. Colocar los sujetadores de la cámara.

Proceso de corrida de PCR

Preparar el mix primero sacando el buffer 5x el magnesio dntps y agua, una vez colocado el buffer el magnesio y los dntps, guardar estos en la congeladora y sacar los primers para que no permanezcan mucho tiempo fuera y no se degraden, colocar el agua, los primers no deben estar congelados, agitar con la misma pipeta que se va a cargar y colocar los primers en el mix, colocar la taq y guardar los primers y la taq en la congeladora. Vortexear todo el mix y colocar la cantidad de mix correspondiente a cada tubo con ADN. Colocar en el termociclador y correr.

Colocar 5ul de ADN de las muestras de tubos de 0,2 ml, numerando cada tapa de cada tubo. Medir las soluciones que se colocaran para el número de muestras que se tienen, más una muestra más, que es el margen de error al colocar el mix.

Anexo 5. Glosario

Diversidad genética: es el número total de características genéticas dentro de cada especie. A mayor diversidad genética las poblaciones poseen mayor resiliencia (Lowe *et al.*, 2005).

Resiliencia: capacidad de las comunidades y ecosistemas de absorber perturbaciones sin alterar significativamente sus características de estructura y funcionalidad, pudiendo regresar a su estado original una vez que la perturbación ha cesado (Holling, 1973).

Diferenciación genética: relativo al índice de fijación (F_{st}). Reducción en la proporción de genes inmigrantes, combinado con deriva y pérdida alélica en pequeñas poblaciones, incrementará la diferenciación genética (Lowe *et al.*, 2005). Si una localidad está aislada de las demás posee mayor diferenciación genética (Gaitán *et al.*, 2003).

Variación genética: relativo a diversidad genética. Es la materia prima para los procesos evolutivos (Montúfar y Brokamp, 2011).

Heterocigosidad: variación genética dentro de individuos. Relativo a apareamiento entre individuos no relacionados, respecto a mayor sobrevivencia de individuos cuando no está en exceso (Gaitán *et al.*, 2003).

Dioica: cuando en una especie existe una separación física entre individuos con flores masculinas y flores femeninas (Montúfar y Brokamp, 2011).

Cade: en palmas, hojas provenientes del individuo macho (Montúfar *et al.*, 2013).

Estípula: en palmas, relativo a hoja joven.

Iteraciones: repeticiones.

Haplotipo: es una combinación de alelos de diferentes loci de un cromosoma que son transmitidos juntos. Un haplotipo puede ser un locus, varios loci, o un cromosoma entero dependiendo del número de eventos de recombinación que han ocurrido entre un conjunto dado de loci (Purcell *et al*, 2007).

Vortexear: relativo al uso del vortex. Máquina de movimiento giratorio para mezclar sustancias o fluidos.

Tabla 5. Matriz de valores *Fst* con su respectiva significación estadística al 5% y distancia geográfica (km) entre localidades de *P. aequatorialis* obtenida en el programa Arlequin (Excoffier et al., 2005).

	Atahualpa	La Palma	Convento	Trinidad	El Mono	Chone	Junín	Santa Rosa	Paján	Ayampe
Atahualpa	0	119,000	28,900	29,000	47,000	80,500	109,000	167,000	177,000	203,000
La Palma	0,023	0	128,000	116,000	85,500	139,000	162,000	225,000	218,000	255,000
Convento	0,106*	0,088*	0	12,400	43,600	53,000	80,800	138,000	148,000	174,000
Trinidad	0,031*	0,023*	0,075*	0	31,200	52,000	81,100	141,000	149,000	177,000
El Mono	0,012	0,021	0,022	0,024*	0	61,900	90,200	154,000	156,000	188,000
Chone	0,024*	0,030*	0,077*	0,062*	0,021*	0	29,400	92,400	97,400	127,000
Junín	0,022	0,051*	0,049*	0,058*	0,012	0,041*	0	64,400	68,000	97,900
Santa Rosa	0,012	0,009	0,080*	0,039*	0,035*	0,032*	0,035*	0	32,000	36,700
Paján	0,034*	0,009	0,048*	0,045*	0,022*	0,010	0,047*	0,006	0	38,300
Ayampe	0,014	0,034*	0,057*	0,057*	0,012	0,026*	-0,007	0,004	0,026*	0

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, DAVID ANDRES VERGARA PACHECO, C.I. 171331101-5; autor del trabajo de graduación intitulado: “Diversidad Genética de *Phytelephas aequatorialis* Spruce en la provincia de Manabí”, previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la Escuela de Ciencias Exactas y Naturales:

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través de sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

DAVID ANDRES VERGARA PACHECO

C.I. 171331101-5

Quito, 2015