

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

**Análisis de paternidad de *Oenocarpus bataua* (Arecaceae) en el Parque
Nacional Yasuní (PNY).**

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

ANDREA PINOS

Quito, 2013

Dedico este trabajo fruto de mi esfuerzo a mi familia y de manera muy especial a mi madre quien me enseñó que para tener éxito hay que luchar, y ser perseverante .

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a las instituciones y personas en particular que de una u otra manera apoyaron para la ejecución de este estudio. El orden en que se mencionarán no presenta prioridad alguna, al contrario sólo quiero citarlos en este preciado documento.

Mis fieles agradecimientos a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por facilitar los recursos necesarios para que se pueda llevar a cabo el estudio, de manera especial al Dr. Rommel Montufar por su valiosa guía como director de tesis, por confiar en mis capacidades y brindarme todo el apoyo necesario para realizar mi tesis, igualmente a los integrantes del tribunal de tesis por sus comentarios Dr. Hugo Navarrete y Dr. Santiago Espinoza.

A las personas a cargo de la Estación Científica Yasuní por las facilidades prestadas el tiempo que duró la fase de campo, igualmente a los mapeadores y a mi guía Huaorani que colaboraron con esta fase.

Mis sinceros agradecimientos al Dr. Renato Valencia por permitirnos el ingreso a la Parcela Dinámica de Bosque Yasuní y por facilitar importante información para realizar el estudio.

Al Dr. Hugo Romero por su colaboración en la elaboración y manejo de datos geográficos.

Al Ing. Julio Sanchez, Dr. Jordan Karubian y colaboradores por su apoyo en la parte de análisis estadísticos de mi tesis.

A las personas que trabajan en el laboratorio 113 de Ecología y Genética molecular de la PUCE en especial a mi amiga y técnica del laboratorio Ana María Troya por compartir sus conocimientos y por su apoyo incondicional en mi tesis durante todos estos años.

A la Dra. Violeta Rafael por ser la persona que me inició en la investigación científica, y por sus consejos que siempre guardaré conmigo.

Agradezco profundamente a mi familia, a mis hermanas y a mi madre por su incondicional apoyo.

A Christian Rea por su paciencia y dulce compañía

A mis amigos y compañeros que estuvieron conmigo a lo largo de esta maravillosa carrera

TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	IX
LISTA DE ANEXOS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	5
3.1. DINÁMICA POBLACIONAL Y SU INFLUENCIA EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE PLANTAS.....	5
3.2. ANÁLISIS DE PATERNIDAD.....	7
3.3. ESPECIE EN ESTUDIO: <i>Oenocarpus bataua</i>	9
3.3.1 TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN.....	9
3.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA.....	9
3.3.3 HÁBITAT.....	10
3.3.4 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA:	11
3.3.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA.....	11
3.4 MARCADORES MOLECULARES.....	12
3.4.1 MICROSATELITES COMO MARCADORES MOLECULARES.....	13
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 OBJETIVO GENERAL.	16
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
5.1 ÁREA DE ESTUDIO: Parque Nacional Yasuní.....	17

5.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS.....	18
5.2.1 DISEÑO DE MUESTREO.....	18
5.2.2 IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS.....	19
5.3 EXTRACCIÓN DE ADN.....	19
5.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERAZA) Y ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS.....	20
5.4.1 VISUALIZACIÓN EN GELES Y OBTENCIÓN DE DATOS.....	20
5.4.2 MEDICIÓN Y TABULACIÓN DE DATOS.....	21
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	21
5.5.1 DESEQUILIBRIO LIGADO.....	22
5.5.2 EQUILIBRIO HARDY –WEINBERG.....	22
5.5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	23
5.5.4. AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL.....	26
5.5.5. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	27
5.5.6. ANÁLISIS DE PATERNIDAD.....	27
6. RESULTADOS.....	30
6.1 OBTENCIÓN DE ADN Y DE DATOS.....	30
6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	30
6.2.1 DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG.....	30
6.2.2 DIVERSIDAD GENÉTICA.....	31
6.2.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA.....	31
6.2.4 ANÁLISIS DE PATERNIDAD.....	31
6.2.5 ANÁLISIS ESPACIAL.....	32
7. DISCUSIÓN.....	33
7.1 DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>O. batava</i>	33

7.2 ESTRUCTURACIÓN TEMPORAL	34
7.2 DISPERSIÓN DE SEMILLAS: Hipótesis de Janzen y Connell.....	38
8. CONCLUSIONES.....	41
9. LITERATURA CITADA.....	42
10. FIGURAS.....	57
11. TABLAS.....	66
12. ANEXOS.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diseño de muestreo en el área de estudio PDBY (25ha) localizada en el Parque nacional Yasuní.....	58
Figura 2 Raíces de los adultos de <i>Oenocarpus bataua</i>	59
Figura 3. Estadío de las plántulas colectadas de <i>Oenocarpus bataua</i> (presencia de 2 pinas).	59
Figura 4. Verificación de la calidad y cantidad ADN visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera <i>Lowmass</i> (bandas cada 100 pb).....	60
Figura 5. Amplificación de primers de <i>O.bataua</i> (Ob01, Ob22) con muestras elegidas al azar, visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera <i>Lowmass</i> (bandas cada 100 pb).....	60
Figura 6. Amplificación con el primer polimórfico visualizado en un gel de poliacrilamida 6% y úrea 5M con una escalera <i>330bp</i> (bandas cada 10 pb).	61
Figura 7. Individuos de <i>Oenocarpus bataua</i> descritos más frecuentemente como parentales de las plántulas estudiadas en la PDBY de 25 ha.....	62
Figura 8. Distribución de Plántulas y primer candidato padre de <i>Oenocarpus bataua</i> estimado con el Programa Cervus 3.5 en 25 ha de la parcela PDBY.....	63
Figura 9 Distribución de Plántulas y segundo candidato padre de <i>Oenocarpus bataua</i> estimado con el Programa Cervus 3.5 en 25 ha de la parcela PDBY.....	64

Figura 10. Correlación para potenciales padres, entre distancias de dispersión (metros) y número individuos (plántulas) de *Oenocarpus bataua*. ($r= 0.239$; $p= 0.001^{***}$).....65

Figura 11. Correlación para potenciales madres, entre distancias de dispersión (metros) y número individuos (plántulas) de *Oenocarpus bataua*. ($r= 0.078$; $p= 0.292^{ns}$).....66

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información de 6 loci aislados para <i>Oenocarpus bataua</i> (Montufar <i>et al.</i> , 2006).....	67
Tabla 2. Protocolo utilizado para amplificar primers de <i>O. bataua</i>	68
Tabla 3. Valores p del análisis de desequilibrio ligado par cada par de loci en todas las poblaciones (método de Fisher) de <i>O. bataua</i> obtenidos con el programa GenePop.....	68
Tabla 4. Composición genética en plántulas de <i>Oenocarpus bataua</i> , analizada con 6 loci de microsatélites (n= 199).....	69
Tabla 5 Composición genética en adultos de <i>Oenocarpus bataua</i> , analizada con 6 loci de microsatélites en (n= 60).....	70
Tabla 6. Matriz de valores D (Jost, 2008) obtenida en el programa SMOGD.....	70
Tabla 7. Resultados comparativos de estudios realizados en palmas en varias localidades del Ecuador y Bosques Amazónicos en Perú (diversidad alélica e índice de endogamia)...	71

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN con el kit PureLink™ Genomic Plant DNA Purification de Invitrogen.....	72
Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN manual (Doyle & doyle modificado).....	74
Anexo 3. Preparación de geles de agarosa.....	75
Anexo 4. Preparación y tinción de los geles de poliacrilamida basado en el protocolo del kit secuenciamiento de Promega.....	76
Anexo 5. Resultados del análisis de paternidad obtenidos con el programa Cervus 3.5.....	79

1. RESUMEN

El flujo génico influye en la estructura genética de las poblaciones silvestres. Los patrones de dispersión, reclutamiento y sobrevivencia han sido evaluados principalmente por ecólogos en especies de clima temperado, mientras que estudios para especies de plantas tropicales a nivel molecular son escasos. Análisis sobre diversidad se han ajustado a modelos de dispersión como el de Janzen y Connell, el cual proporciona el marco conceptual del vínculo entre la dispersión de semillas y el éxito de las plántulas en los bosques tropicales. *Oenocarpus bataua* es la segunda palmera más abundante y representativa del bosque amazónico del PNY (Parque Nacional Yasuní) y aspectos importantes sobre su biología son aún desconocidos.

Las pruebas de paternidad realizadas en poblaciones específicas utilizando microsatélites, permiten determinar el parentesco de las plántulas establecidas y evaluar el producto final del ciclo de dispersión de las semillas. Los objetivos de presente estudio fueron a) Analizar la estructura genética temporal (plántulas, adultos) de las poblaciones de *Oenocarpus bataua* en el PNY; (b) Determinar la distancia promedio de flujo génico entre plántulas y adultos reproductores. El estudio se realizó en la parcela de 50 ha. de la PUCE en el PNY. Se eligió 25 ha donde se realizó los muestreos. Se seleccionó 200 cuadrantes de 20x20 m en donde se colectó 1 plántula/cuadrante (n=200). Se colectó una muestra de tejido vegetal de todos los adultos reproductivos de *Oeocarpus bataua* de las 25 ha (n=44) y transectos en cada lado del plot de estudio (n= 16). El genotipaje se realizó con 6 loci de microsatélites para 259 individuos. Se realizó análisis de diversidad genética y de paternidad con los programas GenPOp, Genalex, Cervus, Smogd y Arlequin.

A nivel generacional, se obtuvo mayor diversidad alélica en plántulas, que en adultos de *Oenocarpus bataua*. Tomando en cuenta que la diferencia de edad entre adultos y plántulas

esta sobre los 50 años, se sugiere que: (i) La selección natural no ha actuado en plántulas debido a su corta edad (selección en contra de individuos homocigotos), (ii) La existencia de eventos recientes que podrían haber favorecido un mayor flujo génico en la zona. Se observó que una correlación altamente significativa con respecto a los potenciales padres, entre eventos de dispersión y número de potenciales hijos. Se evaluó los potenciales parentales con más frecuencia de hijos y se determinó que las semillas están siendo dispersadas largas distancias desde sus progenitores.

La variación histórica podría estar relacionada a mejores condiciones ecológicas que influyen en las poblaciones actuales de plántulas.

Los sistemas de dispersión juegan un papel fundamental en la estructura genética de las poblaciones, en este sentido, nuestros resultados no están a favor del modelo de dispersión propuesto por Janzen y Connell.

La distancia geográfica no se encuentra afectando los patrones de dispersión observados, mientras que la altitud es un factor determinante en la dinámica del flujo génico en las poblaciones de *O. bataua* estudiadas

PALABRAS CLAVE: Estructura genética, flujo génico, paternidad, *Oenocarpus bataua*, dispersión.

2. ABSTRACT

The gene flow influences the genetic structure of wild populations. Dispersal patterns, recruitment and survival were evaluated mainly by ecologists in temperate climate species, while studies for tropical plant species at the molecular level are limited. Analyses of diversity have been adjusted to dispersion models like Janzen and Connell, which provides the conceptual framework of the relationship between seed dispersal and seedling success in tropical forests. *Oenocarpus Bataua* is the second palm species most abundant in PNY (Yasuni National Park), however important aspects of their biology are still unknown. Paternity tests conducted in specific populations using microsatellites allow to determine parentage of seedlings established and to evaluate the cycle of seed dispersal. The aims of this study were: a) To analyze the temporal genetic structure (seedlings, adults) populations in the PNY (Yasuni National Park) *Oenocarpus bataua*; and (b) To determine the average distance of gene flow between seedlings and breeding adult. The study was conducted in the 50 ha plot. PUCE in the PNY. Twenty five ha were chosen where sampling was conducted. We selected 199 quadrats of 20x20 m where seedlings were collected 1 / quadrant (n = 199). All adults reproductive were collected in 25 ha (n = 44) and transects on each side of the plot of study (n=16). Genotyping was performed with 6 microsatellite loci for 259 individuals. We performed analysis of genetic diversity and paternity with GenPOp, Cervus, Smogd and Arlequin programs.

A generational level, seedlings have more allelic diversity than *Oenocarpus bataua* adults. Considering that the age difference between adults and seedlings is about 50 years, it is suggested that: (i) Natural selection has not acted yet on seedlings due to their young age (selection against individuals homozygous), (ii) the existence of recent events that could have

avored greater gene flow in the area. It was observed that a highly significant correlation with respect to potential parents, between events and number of potential dispersions children. We evaluated the potential parent children more often and it was determined that the seeds are being dispersed long distances from their parents.

The historical variation may be related to improved ecological conditions that influence current populations of seedlings. Dispersion systems play a key role in the genetic structure of populations, in this sense, our results are not in favor of the dispersion model proposed by Janzen and Connell.

Geographical distance is not affecting dispersal patterns observed, while the altitude is a factor in the dynamics of gene flow in populations of *O. bataua* studied

KEYWORDS: Genetic structure, gene flow, parentage, *Oenocarpus bataua*, dispersion.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DINÁMICA POBLACIONAL Y SU INFLUENCIA EN LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE PLANTAS

La dinámica poblacional está influenciada no solo por fuerzas evolutivas como selección natural, endogamia o deriva génica, sino también, por procesos demográficos e históricos que influyen en la estructura genética de las especies de plantas (Hamilton, 1999). La magnitud de estas fuerzas se encuentra relacionada con la habilidad reproductiva y la tasa de flujo génico, que son la base de la estructura genética en las poblaciones (Gaiotto *et al.*, 2003).

La habilidad reproductiva está determinada por la dispersión de semillas y polen. La dispersión de semillas induce el movimiento de alelos tanto maternales como paternales, mientras que la polinización solo contribuye con alelos paternales (Karubian *et al.*, 2010; Lowe *et al.*, 2004). Estos mecanismos junto con la predación, competencia, permiten el establecimiento de plántulas y colonización de nuevas áreas (Sezen *et al.*, 2009).

Las consecuencias ecológicas de la dispersión y polinización se evidencian cuando van acompañadas de flujo génico (Loveless y Hamrick, 1984); es decir, cuando suponen un cambio en las frecuencias alélicas o distribución de los genotipos entre y dentro de las poblaciones (Escudero *et al.*, 2003). 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 poblaciones (Wright, 1943). En cambio, mecanismos eficaces de dispersión a media y larga distancia, permiten niveles altos de flujo génico que incrementan la base genética, reducen la endogamia y mantienen poblaciones biológicamente viables y genéticamente homogéneas (Lowe *et al.*, 2005). La caracterización efectiva de la cantidad y diversidad genética asociada al movimiento de

propágulos, en sus dos componentes: polínica y de semillas, es fundamental para comprender la dinámica de las poblaciones actuales y como estas intercambian su material genético. Esta información permite el diseño efectivo de estrategias de conservación.

En el caso específico de las especies de plantas tropicales, como las palmas, la dispersión es fundamental para el reclutamiento y regeneración de un bosque. Los propágulos no dispersados sufren altas tasas de mortalidad cerca de los adultos (mortalidad dependiente de la distancia) (Harms *et al.*, 2000; Metz y Sousa, 2010; Swamy y Terborgh, 2010), mientras que los propágulos dispersados a largas distancias presentan mayores tasas de supervivencia.

Los efectos de la dispersión de semillas han sido analizados utilizando modelos de diversidad que tratan de explicar el mantenimiento de la alta diversidad de especies de árboles en los bosques tropicales (Loveless y Hamrick, 1984). Los modelos de diversidad incluyen: el modelo de lotería (Chesson y Warner, 1981), la hipótesis de disturbio intermedio (Connell, 1979), la hipótesis de la regeneración de nicho (Grubb, 1977), el modelo de heterogeneidad de recursos (Tilman, 1982) y el modelo de Janzen-Connell (Janzen, 1970; Connell, 1971). Este último también se refiere a la hipótesis de escape (Howe y Smallwood, 1982), hipótesis compensación- mortalidad (Condit *et al.*, 1992), o el mecanismo de espaciamiento de Janzen. Dichos modelos proporcionan el marco conceptual del vínculo entre la dispersión de semillas y el éxito de las plántulas en los bosques tropicales.

Los modelos de Janzen (1970) y Connell (1971) constituyen la hipótesis más estudiada en los bosques tropicales. Sugieren que el reclutamiento de las plántulas cerca de los padres puede reducirse como resultado de la densidad dependiente de la mortalidad, debido a depredadores (herbívoros) que normalmente se alimentan de los adultos y también a patógenos que concentran sus actividades cerca de los mismos, en donde las semillas caen con mayor frecuencia (Clark y Clark, 1984). Por lo tanto, con la probabilidad de reclutamiento baja, cerca

de los adultos de la misma especie, la probabilidad de establecimiento de otras especies en estos sitios aumenta. En otras palabras el bajo reclutamiento cerca de los padres reduce el potencial de dominio de una sola especie en la comunidad y permite conservar la alta diversidad de especies en bosques tropicales (Burkey, 1994; Clark y Clark, 1984). Así la probabilidad de reclutamiento exitoso puede incrementar con el aumento de la distancia desde los árboles padres (Burkey, 1994; Sezen *et al.*, 2009).

Un método directo para el estudio de flujo génico y análisis de estos modelos de dispersión es realizando pruebas de paternidad en poblaciones utilizando marcadores moleculares (Gaiotto *et al.*, 2003; Karubian *et al.*, 2010). Esta metodología permite determinar el parentesco de las plántulas establecidas y sus potenciales padres, por lo tanto estimar las distancias promedio entre plántulas y árboles parentales (Ashley, 2010).

El conocimiento del efecto de la dispersión y reclutamiento permite entender los mecanismos de flujo génico en las poblaciones. Estos mecanismos y en particular la dispersión, da pautas para desarrollar estrategias dirigidas a preservar los procesos que favorecen el flujo de genes y la resiliencia de las poblaciones a la fragmentación del paisaje u otros cambios abióticos (Dick *et al.*, 2003). Esto ayuda al manejo y conservación de poblaciones vegetales y determina la capacidad que tienen las especies de plantas para dispersarse en un hábitat heterogéneo y dinámico (Ashley, 2010).

3.2 ANÁLISIS DE PATERNIDAD

Mediante la comparación del genotipo de un individuo dado con el de todos los progenitores potenciales de una población, el análisis de parentesco puede llegar a identificar el padre, madre o pareja parental más probable para un nivel de significación dado (Gerber *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 1998).

A partir de la asignación (o exclusión) de parentesco, es posible estimar distancias de dispersión, variables del sistema de reproducción tales como la tasa de autogamia o el número efectivo de padres de una progenie (Ritland, 2002), o tasas de inmigración de individuos desde el exterior de la población (Slavov *et al.*, 2005). Es posible además estimar conjuntamente parámetros fenotípicos o ambientales que afectan el éxito reproductor de los individuos, lo que permite ajustar los denominados gradientes de selección (Burczyk *et al.*, 2006).

A partir del descubrimiento de los microsatélites hace más de un cuarto de siglo (Litt y Luty, 1989), y su caracterización en el genoma de plantas, han sido cada vez más utilizados para el análisis de la estructura genética, flujo génico y para estudios de paternidad en poblaciones (Condit y Hubbell, 1991). Estos estudios (Chase *et al.*, 1996; Dayanandan *et al.*, 1999) permiten comprender de mejor manera la dinámica poblacional en plantas. Sin embargo, para la gran mayoría de las especies que pertenecen al grupo de las palmas, componentes importantes para los ecosistemas de bosques tropicales, estudios detallados de flujo de genes y paternidad son limitados.

En los trópicos se han realizado estudios de paternidad con microsatélites en poblaciones de palmito (*Euterpe edulis*) en Brazil (Gaiotto *et al.*, 2003), *Iriartea deltoidea* en Costa Rica (Sezen *et al.*, 2005; 2009; 2007), *Attalea phalerata* en Perú (Choo *et al.*, 2012), *Astrocaryum mexicanum* en México (Eguiarte *et al.*, 1993), y *Elaeis guineensis* en Tailandia (Thongthawee *et al.*, 2010).

Existe un estudio de paternidad con *Oenocarpus bataua* en el Chocó ecuatoriano. Karubian *et al* (2010) reportó los patrones de dispersión con microsatelites relacionada a un lek (zona de reproducción y alimentación) de aves que se alimentan de los frutos de la palma. A pesar de las expectativas generadas sobre sus usos potenciales y de la ventaja de tener una batería

desarrollada de microsatélites para la especie (Montúfar *et al.*, 2007) existe una carencia de estudios a nivel molecular.

3.3 ESPECIE EN ESTUDIO: *Oenocarpus bataua*

3.3.1 TAXONOMÍA Y DISTRIBUCIÓN

Las palmas son un grupo de plantas diversas y abundantes que pertenecen a la familia Arecaceae. Esta familia vegetal agrupa más de 3000 especies que se encuentran en hábitats como montañas, tierras bajas, desiertos y bosques lluviosos (Henderson, 2002). Son consideradas como un grupo interesante para estudios en biología reproductiva (Henderson, 2002; Núñez *et al.* 2005) debido a su amplia variación morfológica, discontinua fenología, distintos modelos de crecimiento y especialización ecológica (Ulhy Moore, 1977).

Oenocarpus bataua (ungurahua, ungurahui, seje, mil pesos, chapil) (Henderson, 1995) se distribuye ampliamente en las regiones tropicales y subtropicales del noroeste de Sudamérica (Ecuador, Colombia, Brasil, Guyanas, Panamá y Bolivia (Balick, 1986; Henderson, 1994), incluyendo la isla de Trinidad en el Caribe (Montúfar y Pintaud, 2008). En el Ecuador *O. bataua* se la observa en las estribaciones andinas, bajo los 1000 msnm; sin embargo, existen registros sobre los 1110 - 1400 m (Borgtoft–Pedersen y Balslev, 1993).

3.3.2 DESCRIPCIÓN MORFOLÓGICA

Oenocarpus bataua es una palmera arborescente de tronco solitario y recto, que alcanza los 25 a 30 metros de altura (Montúfar y Pintaud, 2008). Presenta hojas compuestas y dispuestas en espiral, formando una corona en forma de V de más de seis metros de altura. Las hojas pueden medir hasta 11 metros (incluido vaina, peciolo y raquis) (Borgtoft-Pedersen y Balslev, 1993), *O. bataua* presenta de 100-150 pinnas dispuestas regularmente y orientadas en un solo

plano; el envés de las pinnas está recubierto por un tomento blanquecino. La inflorescencia hipuriforme (cola de caballo) con aproximadamente 100-200 raquillas. Las flores forman tríadas (1 flor femenina y 2 flores masculinas) en la parte distal de las raquillas y diadas o flores solitarias en la parte proximal de las raquillas (Balick, 1992). Los frutos son drupas ovoides o elipsoides, de color verde pálido cuando son inmaduros, hasta un color negro violáceo en la madurez (Borgtoft-Pedersen y Balslev, 1993). Cada fruto maduro alcanza los 4 cm. de largo y entre 1.7 a 2.2 cm de ancho (Moraes, 2004). Las semillas son duras, leñosas y cubiertas por fibras oscuras, las raíces están generalmente bien desarrolladas, pudiendo desplazarse hasta 6 o 7 metros a los lados (Nuñez y Rojas, 2008).

3.3.3 HÁBITAT

Oenocarpus bataua, forma parte del dosel de bosques tropicales de tierras bajas y bosques montanos bajos (Borgtoft-Pedersen y Balslev, 1993). *O. bataua* presenta dos ecotipos: (i) poblaciones densas en bosques sobre suelos mal drenados (pantanos) de la amazonía baja (Perú y cuenca amazónica) (ii) poblaciones densas en bosques sobre suelos bien drenados (colinas) en la amazonía alta (Ecuador) (Montúfar *et al.*, 2010).

El crecimiento de *O. bataua* es favorecido por la cantidad de luz durante el desarrollo, sin embargo, requiere sombra para la germinación en condiciones silvestres (Borgtoft-Pedersen y Balslev, 1993; Miller, 2002; Sist y Puig, 1987). Por otro lado se considera que la mortalidad de jóvenes es alta, resultando una estructura poblacional piramidal, es decir, en condiciones naturales se puede observar una gran cantidad de plántulas y juveniles jóvenes, pocos juveniles más viejos y muy pocos subadultos y adultos (Clark *et al.*, 1998)

3.3.4 BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Debido a su abundancia en los bosques tropicales y a la alta cantidad de frutos (Miller, 2002), *O. bataua* es considerada un recurso importante para animales frugívoros que dependen de los mismos especialmente en épocas donde otros frutos son escasos (Terborgh, 1983). Los animales tienen un rol importante para las poblaciones *O. bataua*, ya que al consumir los frutos, mueven las semillas lejos de sus parentales, contribuyendo a la dispersión de la especie (Henderson, 2002). Las aves como los loros, tucanes y pavas consumen las semillas de *O. bataua* y potencialmente las dispersan lejos de los parentales (Castaño *et al.*, 2007). Los roedores y mamíferos pequeños como el sajino (*Pecari tajacu*) y la huangana (*Tayassu pecari*) también aprovechan el mesocarpo oleaginoso de los frutos, y por ende actúan como distribuidores y predadores de semillas (Miranda *et al.*, 2008).

Adicionalmente varias especies de primates consumen frutos de *O. bataua*, entre estas especies están los monos de los géneros *Cebus* “Monos capuchinos”, *Pithecia*, *Lagothrix* y *Ateles belsebuth* “Mono araña” (Castaño *et al.*, 2007). El hombre también es un importante dispersor debido al consumo de los frutos en la dieta de los pueblos amerindios (Balick, 1992).

En cuanto a la polinización de *O. bataua* se conoce que las inflorescencias son protándricas (órganos masculinos maduran antes que los femeninos) (Dransfield *et al.*, 2008), y sus principales polinizadores son algunas especies de insectos de los géneros *Phyllotrox*, *Derelomini* y *Mystros*. El viento tiene poca o ninguna importancia en la polinización (Borgtoft–Pedersen y Balslev, 1993).

3.3.5 IMPORTANCIA ECONÓMICA

Oenocarpus bataua tiene numerosos usos para los pueblos amerindios (Balick, 1979; Pedersen y Balslev, 1992; Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995). El aceite aislado

del mesocarpo es rico en aceites comestibles, de los cuales se elaboran pulpas de frutas y bebidas nutritivas. Los frutos pre-cocidos son vendidos en los mercados locales de la Amazonía (Balick, 1992; Balick y Gershoff, 1981). Adicionalmente, el aceite derivado del fruto es utilizado con fines médicos y cosméticos (cremas, jabones, tónicos capilares) en la región amazónica ecuatoriana, e incluso en tiendas de fitoterapia en las principales ciudades como Quito y Guayaquil (Balick, 1986; Montúfar *et al.*, 2010).

Las hojas son utilizadas para fabricar canastas, y debido a su característica de ser impermeables y dejar pasar el humo, son usadas para elaborar techos o para realizar divisiones en las viviendas (Balick, 1992; Zuluaga, 1997). Los troncos se usan como criaderos de las nutritivas larvas de “Suri” (*Rhynchophorus palmarum*) (Balick, 2002).

Al igual que varias especies forestales no maderables, *O. bataua* permite el aprovechamiento de distintas partes que no necesariamente implican la muerte de la palma, y más bien permite una diversificación de los productos extraídos y potencialmente comercializados, que incluyen el estípote (fuste), las hojas, flores, frutos y semillas (Norheim, 1996).

3.4 MARCADORES MOLECULARES

Los marcadores moleculares son todas aquellas moléculas (proteínas o ADN) que se pueden identificar y caracterizar para definir un genotipo determinado (Freeland, 2005; Hillis, 1987). Gracias al desarrollo de las técnicas moleculares y nuevas herramientas estadísticas, los marcadores moleculares permiten observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones con la finalidad de estimar niveles o patrones de flujo génico, así como identificar de la variación genómica para estudiar diversos aspectos en los organismos de manera detallada y con alta resolución (Slatkin, 1985; Avise, 1994). La variación genética, conocida como polimorfismo, es el resultado de los cambios espontáneos en el ADN debido a la

substitución de un nucleótido, o mutaciones que involucren mayores números de sitios nucleotídicos (Dodgson *et al.*, 1997).

Un buen marcador molecular debe reunir una serie de características para maximizar su utilidad, entre ellas: herencia estable (baja tasa de mutación), alta variabilidad, elevada reproductividad, la ausencia de alelos nulos (produce ausencia de un determinado fenotipo), técnica de fácil implementación, económico, y alta tasa de transferibilidad de información (Cheng y Crittenden, 1994). Sin embargo, la elección del marcador depende de la pregunta que se desee contestar, por ejemplo, si hablamos de especies que están cercanamente relacionadas, el marcador molecular a elegir deberá presentar una alta variabilidad, mientras que para especies más distantes el marcador puede ser menos variable (Freeland, 2005).

Los marcadores moleculares se dividen en dos grupos principales: dominantes y codominantes (Simpson, 1997). Los marcadores dominantes son aquellos que revelan un simple alelo dominante, por ejemplo los AFLPs, RAPDs, ISSRs (Ovesná *et al.*, 2002). Mientras que los marcadores codominantes son aquellos que permiten identificar todos los alelos que se encuentran presentes en un locus en particular, entre estos se encuentran los microsatélites (Freeland, 2005).

3.4.1 MICROSATELITES COMO MARCADORES MOLECULARES

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSRs) (Litt y Luty, 1989), son secuencias de ADN formadas de 1 a 6 pares de bases repetidas en tándem entre 10 y 30 veces e intercaladas al azar en las regiones no codificantes de los genomas de todos los organismos eucariotas (Gupta *et al.*, 1994); pueden ser: mononucleótidos (eg.,TT)_n, dinucleótidos (eg.,AT)_n, o tetranucleótidos (eg.,AAGG)_n (Bruford y Wayn, 1993). Los SSRs no tienen una función específica pero se cree que pueden intervenir en el mantenimiento de la estructura de

los cromosomas y facilitar el empaquetamiento del DNA durante la condensación cromosómica en la meiosis (Gross y Garrad 1988). Los SSRs también han sido asociados con puntos de alta frecuencia de recombinación conocidos como hot spots (Murphy y Stringer, 1986) y con la regulación génica, interviniendo en el incremento y reducción de la velocidad de la transcripción de un gen (Clark, 1990; Hamada *et al.*, 1984).

Otra característica de los microsátélites es que son marcadores neutros, por lo tanto, sus frecuencias no se ven modificadas como consecuencia de la selección llevada a cabo en una población (Goldstein y Schlotterer, 1999). Para un marcador neutral, el grado de polimorfismo está en función de la tasa de mutación, que en este caso es de 10^{-2} a 10^{-6} eventos por locus y por generación, la cual es superior a la del ADN no repetitivo que es de 10^{-9} por locus y por generación (Estoup y Cornuet, 1999).

Los microsátélites representan uno de los tipos de ADN más variables dentro del genoma, reflejado por los cambios en el número de unidades repetitivas (polimorfismos de longitud). En otras palabras la mutación de los microsátélites implica un cambio en el tamaño de una repetición, pero a veces se ven involucradas varias unidades de repetición (Beckmann y Weber; 1992). En este sentido se han formulado modelos de mutación; el uso de un modelo de mutación específico es clave para estimar parámetros en las poblaciones, tales como: diferenciación genética, número de migrantes por generación, etc. En el caso de los microsátélites se han propuesto dos modelos de mutación opuestos, el modelo infinitesimal (IAM) basado en que una mutación involucra cualquier número de repeticiones y siempre resulta en un alelo que no existía en la población (Kimura y Crow, 1964) y el modelo de mutación por pasos (SMM) el cual describe la mutación de los alelos de los microsátélites por

la pérdida o ganancia de una unidad de repetición de la serie y que puede mutar y convertirse en algún alelo ya existente en la población (Kimura y Ohta 1978).

Los microsatelites versus otros marcadores moleculares (minisatélites, AFLPs, RAPDs, etc.) tienen características como: alto grado de polimorfismo, herencia mendeliana simple, codominancia, fácil medición y análisis, alto porcentaje de confiabilidad, repetitivos y automatizables (Goldstein y Schlotterer, 1999). Además son secuencias conservadas entre especies próximas (Stallings *et al.*, 1991), por lo que los primers o cebadores utilizados para amplificar una determinada secuencia en una especie, sirven para la amplificación de una secuencia análoga en una especie cercana, es decir, presentan un alto porcentaje de transferibilidad (Moore *et al.*, 1991). Debido a estas diversas ventajas, los microsátélites, han sido utilizados ampliamente para realizar pruebas de paternidad, las cuales se basan en el principio mendeliano de que uno de los alelos que presenta un individuo proviene del padre y el otro de la madre, es decir, la comparación del genotipo de la descendencia con el de sus progenitores (Ashley, 2010).

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL.

Investigar los patrones espaciales de la variabilidad genética de la especie de palma *Oenocarpus bataua* en el Parque Nacional Yasuní (PNY).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Analizar la estructura genética temporal (plántulas versus adultos) de las poblaciones de *Oenocarpus bataua* en 25 ha de la Parcela Dinámica de Bosque Yasuní (PDBY).
- Determinar la distancia promedio de flujo génico entre plántulas y adultos reproductores

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO: Parque Nacional Yasuní

El estudio se realizó dentro del Parque Nacional Yasuní (Provincia de Orellana). El Parque Nacional Yasuní (PNY) es una de las reservas de mayor diversidad biológica del planeta y área de gran interés científico (Taco, 2001).

Dentro del PNY se encuentra la parcela de 50 ha, establecida por el Proyecto Dinámica de Bosque Yasuní (PDBY), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Comprende 50 ha de bosque primario continuo, considerado como un laboratorio óptimo para explorar los patrones espaciales de la variabilidad genética. El objetivo del proyecto PDBY fue conocer la estructura del bosque en base a una muestra de 50 ha y la dinámica poblacional (regeneración, mortalidad y crecimiento) de las plantas leñosas en el Yasuní (Valencia *et al.*, 2004). La PDBY tiene información detallada de la topografía y estructura del bosque que son útiles para inferencias ecológicas. Además ofrece una oportunidad única para explorar los patrones espaciales de la variabilidad genética, ya que mantiene una zona de 50 ha con la ubicación exacta y la densidad de plantas adultas; de tal manera que pueden ser fácilmente localizadas y mapeadas.

La parcela del PDBY se ubica cerca de la carretera Maxus. Su acceso se encuentra en el Km 5,3 de la vía NPF (Northern Production Facilities) (00° 38'S, 76° 30'W; 260 m de altitud), la entrada se encuentra a un kilómetro de la Estación Científica Yasuní (ECY) La parcela y sus alrededores ha permanecido sin disturbios mayores desde su establecimiento en 1995 (Valencia *et al.*, 2004). Una vez abierta la carretera, se determinó un lugar estratégico para el establecimiento de la misma, tomando en cuenta como principal criterio la integridad de este bosque.

La PDBY se encuentra a una altitud promedio de 230 m sobre el nivel del mar. La diferencia entre el punto más alto y el más bajo es de 33,5 m (Valencia *et al.*, 2004). En cuanto a su topografía esta descansa sobre dos pequeñas lomas, con inclinaciones tenues. En estas pendientes el suelo es rojizo y arcilloso debido al desprendimiento de las capas orgánicas y nutrientes que se produce por efectos de las lluvias. Las partes más bajas de la parcela se encuentran conformadas por los valles o quebradas que se forman entre las colinas, formadas por tierras aluviales grises y cafés, donde existen riachuelos permanentes (Athens, 1997).

5.2 COLECCIÓN DE MUESTRAS

5.2.1 DISEÑO DE MUESTREO

Para realizar esta investigación se eligieron 25ha continuas de las 50 ha que comprende la parcela. Esta elección se realizó tomando en cuenta las condiciones topográficas del terreno, favoreciendo las zonas de colinas en donde la densidad de la especie es mayor.

Las 25ha elegidas se encuentran divididas en 625 cuadrantes de 20 x 20m. Para el muestreo de plántulas se seleccionó al azar 200 cuadrantes de 20x20m de los 625. En los cuales se colectó un pedazo de 1cm x 2cm de tejido vegetal de un solo individuo de *O. bataua*. Si se reportaba la presencia de varias plántulas por cuadrante se seleccionó al azar al individuo para ser estudiado en total se colectó 199 plántulas (una plántula fue descartada).

Para los individuos adultos, se colectaron muestras de tejido foliar o raíces de todos los individuos dentro de las 25 ha estudiadas, en total se colectó 44 individuos adultos (tronco visible y presencia de estructuras reproductivas) (Figura 2).

Adicionalmente se incluyó en el diseño de colecta adultos reproductivos cercanos a la parcela de 25 ha. Se trazó tres transectos perpendiculares de 200x50m en cada una de las

direcciones de la parcela de 25ha (Norte, Sur, Este y Oeste), la distancia entre los transectos fue de 100m, se obtuvo un total de 16 individuos adultos fuera del área de estudio (Figura 1).

5.2.2 IDENTIFICACIÓN DE MUESTRAS

Una vez establecido el diseño de muestreo se realizó la identificación de adultos y plántulas de *O. bataua* en el campo. Se definió como plántula aquellos individuos en los que se observó la presencia de dos pinas y de la semilla en su raquis (Figura 2) (Figura 3).

5.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Se colocó el material colectado en sobres de papel con sílica gel para evitar la descomposición del mismo. 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 (laboratorio113), para lo cual se utilizó un formato en el que constaron coordenadas geográficas del punto exacto en donde se colectó cada muestra, tipo de tejido (hoja o raíz), número de cuadrante y subcuadrante donde se colectó la muestra, medidas de peciolo, raquis, número de pinas de las plántulas, densidad de individuos circundantes de *O. bataua*, tipo de topografía y observaciones generales.

El tejido vegetal colectado fue fraccionado en porciones pequeñas para luego ser maceradas en un mortero hasta que el tejido se haya pulverizado totalmente (aprox. 0.1gr). Posteriormente el pulverizado se colocó en tubos eppendorf siguiendo las instrucciones del kit PureLink™ GenomicPlant DNA Purification de Invitrogen (Anexo 1). También se realizó extracciones manuales siguiendo el protocolo modificado de Doyle y Doyle, 1987 (Anexo 2). Una vez aislado, el ADN fue cuantificado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y

teñidos con bromuro de etidio para evidenciar, mediante luz UV, la concentración y calidad de ADN en la solución (Anexo 3).

5.4 PCR (REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERAZA) Y ESTANDARIZACIÓN DE PROTOCOLOS

Se utilizó el ADN aislado para realizar pruebas de amplificación, de esta manera, en algunos casos se evidenció la necesidad de reducir o aumentar la ADN con el fin de asegurar la amplificación. Las PCRs fueron realizadas con 6 loci de microsatélites (SSRs) desarrollados para *O. bataua* por lo que no fue necesario realizar transferencia de primers de especies cercanas (Montúfar *et al.*, 2006) (Tabla 1). El protocolo que se utilizó para el uso de los primers de microsatélites fue el mismo que el propuesto por sus respectivos autores (Montúfar *et al.*, 2006) (Tabla 2). Una vez obtenidas las amplificaciones se las visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% y con ayuda de una escalera molecular, donde fueron evidenciadas mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz UV, con el fin de observar calidad y concentración del amplificado (Figura 4).

5.4.1 VISUALIZACIÓN EN GELES Y OBTENCIÓN DE DATOS

Se denaturó todas las muestras amplificadas mediante temperatura (95°C por 5min), con un agente químico denaturante (formamida al 98%), puesto directamente en el producto PCR para cada muestra (10ul). Posteriormente se corrió las muestras en geles denaturantes de poliacrilamida al 6% 5M úrea con la ayuda de una escalera molecular de 330bp previamente denaturada (72°C 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 del kit de secuenciamiento de Promega (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 (Figura 6).

5.4.2 MEDICIÓN Y TABULACIÓN DE DATOS

Los datos fueron obtenidos a partir de los geles de acrilamida realizados. Se marcó el peso (pb) de las bandas representadas en la escalera molecular de 330pb y también se marcó las bandas correspondientes a cada alelo, se midió la distancia que habían recorrido (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 en el cual se comparó la distancia migrada por cada banda de la escalera y el peso molecular (pb).

Al ser los microsatélites marcadores codominantes en especies diploides, nos permiten observar los dos alelos presentes en cada individuo para un locus en particular, razón por la cual los datos obtenidos se manejaron en una matriz binaria (ausencia y presencia) y posteriormente se transformó a una matriz alélica en el programa GenAEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2005).

5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Se utilizó los programas informáticos GenePop 4.0.10 (Raymond y Rousset, 1995^a) disponible en la página web <http://genepop.curtin.edu.au/>, GenAEx 6.0 (Peakall y Smouse, 2005), Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005), Cervus 3.5 (Marshall *et al.*, 1998) y SMOGD 1.2.5 disponible en la página web <http://www.ngcrawford.com/django/jost/> (Crawford, 2010).

5.5.1 DESEQUILIBRIO LIGADO

Cuando dos alelos se encuentran ligados en el mismo cromosoma se transmiten juntos en cada meiosis hasta el momento en que se cruzan entre ellos y se distribuyen en distintos gametos asociándose independientemente (Weir, 1996). Sin embargo, esta asociación puede no ocurrir. Esta asociación no aleatoria de alelos en un loci ligado se denomina desequilibrio ligado (Freeland, 2005). Para comprobar si los diferentes loci se encuentran asociados independientemente entre sí o no, se realizó un análisis de desequilibrio ligado, asociando pares de loci diploides (Weir, 1996). Para este análisis se utilizó el programa GenePop (Raymond y Rousset, 1995^a) con los valores *default* de los parámetros de la cadena Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000). Dicho programa crea tablas de contingencia para cada par de loci, y luego se calcula una prueba G (estadístico de relación de probabilidad del logaritmo) para cada tabla usando el algoritmo de Markov mencionado (Raymond y Rousset, 1995b).

5.5.2 EQUILIBRIO HARDY –WEINBERG (HW)

El equilibrio HW es un postulado que se aplica a la genética de poblaciones. Nos indica que una población está en equilibrio cuando no actúan factores externos como la selección natural, migraciones o mutaciones. Este equilibrio se manifiesta cuando se observa que las proporciones genotípicas y por lo tanto fenotípicas (respecto a un carácter) de una población se mantienen constantes, como consecuencia de esto se asume que la herencia mendeliana (leyes de Mendel) no induce cambios evolutivos por si misma (Guo y Thompson, 1992; Lowe *et al.*, 2004). Por lo tanto, la constitución genética de una población se puede describir por el conjunto de frecuencias alélicas (alelos presentes en cada locus) y el número o proporción de los diferentes alelos en cada locus (Gillespie, 1998).

Una población diploide se considera en equilibrio Hardy-Weinberg (HW) si los alelos de un Locus específico se encuentran distribuidos al azar en una población y no existe asociación entre el par de alelos que un hijo recibe de sus padres (Hardy, 1908; Weinberg, 1908). Los principales factores que se encuentran involucrados en las desviaciones del HW son: los apareamientos no producidos al azar (no existe panmixia), la selección natural (ventaja de los heterocigotos), migración o flujo de genes desde una población externa, presencia de alelos nulos no detectables experimentalmente, entre otros (Freeland, 2005; Lowe *et al.*, 2004).

Para calcular el equilibrio Hardy-Weinberg se utilizó el programa GenePop y se corroboró los resultados con el programa Cervus 3.5. Lo que hace GenePop es realizar “la prueba exacta Hardy-Weinberg” descrita por Haldane, (1954), Weir (1996), Guo y Thompson (1992) y otros. Esta prueba permite definir la zona de rechazo utilizando la probabilidad de las muestras observadas, y los valores p corresponden a la suma de las probabilidades de todas las tablas con la misma probabilidad. Se utilizó los valores *default* de los parámetros de la cadena Markov (número de dememorización: 1000, número de lotes: 100, número de iteraciones: 1000). El programa calculó automáticamente un test global (Método de Fisher) para conocer los valores globales Hardy-Weinberg de cada población.

5.5.3 DIVERSIDAD GENÉTICA

Se utilizó el programa Cervus 3.0 que analiza datos de marcadores moleculares, asumiendo que los marcadores son autosómicos y que la especie es diploide (Slate *et al.*, 2000). Cervus calcula mediante la opción de frecuencias alélicas incorporado en el programa: heterocigocidad esperada y observada y número de alelos. Las frecuencias alélicas estiman la diversidad alélica en una población, y no son más que el número promedio de alelos por locus (Freeland, 2005).

El cálculo de dichas frecuencias dependen del tamaño de muestra, al igual que la heterocigosidad observada (H_o), que se refiere a la proporción de individuos heterocigotos observada en una muestra de la población y que es calculada al dividir el número de heterocigotos en un locus en particular por el número total de individuos muestreados (Freeland, 2005). Por otro lado la heterocigosidad esperada (H_e) o diversidad génica (Nei, 1987), se define matemáticamente como la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes (Crow y Kimura 1970). Esta es una prueba menos sensible al tamaño de la muestra (Freeland, 2005) y se calcula como (Nei, 1973):

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

p_i : frecuencia del alelo I

k: número de alelos

Este estadístico es equivalente a la heterocigosidad observada (H_o) cuando las poblaciones están en (HWE).

Adicionalmente se calcularon F estadísticos o también llamados índices de fijación, desarrollados por Wright (1951) con el programa GenePop. Los F estadísticos proponen medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones por medio de tres parámetros: F_{IS} , F_{IT} 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). F_{IT} es la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total, respecto a las esperadas considerando que existe equilibrio Hardy-Weinberg. F_{ST} es la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en las subpoblaciones respecto a

las esperadas considerando el equilibrio Hardy-Weinberg (Freeland, 2005; Robertson y Hill, 1984). Los tres parámetros se relacionan por medio de la siguiente ecuación:

$$F_{ST} = 1 - (1 - F_{IT}) / (1 - F_{IS})$$

Por lo tanto, F_{ST} indica el grado de diferenciación genética entre las subpoblaciones.

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

$$F_{IS} = \frac{HS - HI}{HS}$$

$$F_{ST} = \frac{HT - HS}{HT}$$

$$F_{IT} = \frac{HT - HI}{HT}$$

En donde HI es la heterocigosis observada (individuos heterocigotos) en la subpoblación HS es la heterocigosis esperada (por H-W) en la subpoblación y HT es la heterocigosis esperada (por H-W) en la población total. 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 población 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 población, y GenePop para comparar concordancia en los resultados.

5.5.4. AUTOCORRELACIÓN ESPACIAL

Se realizó una prueba de Mantel en el programa GenAlEx 6.0 este test permite comprobar la existencia de una relación estadística entre los elementos de dos matrices, en este caso se utilizó una matriz de distancia genética y una matriz de distancia geográfica para probar una autocorrelación espacial (Mantel, 1967). Se tomó en cuenta las matrices de las poblaciones de adultos y plántulas por separado para obtener dos índices independientes.

El test de Mantel básico es simplemente la suma de los productos de los elementos correspondientes de las matrices:

$$Z = \sum_{ij} X_{ij} Y_{ij}$$

Donde:

\sum_{ij} : es la doble sumatoria de todo i y de todo j donde $i \neq j$.

Z : cualquier valor en función de la naturaleza exacta de X y Y .

Las distancias de dispersión en metros se obtuvieron manualmente con el uso del programa ArcMap de la serie integrada de software de información geográfica ArcGis 10.1 (ESRI, 2009). Se midió la distancia de plántulas hacia los dos candidatos parentales más probables determinados por el programa Cervus. Dependiendo de la cercanía de la plántula a los candidatos parentales se eligió el padre y madre de cada plántula y se obtuvo el rango mínimo y máximo de dispersión observado.

5.5.5. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Para poder analizar la diferenciación genética entre las poblaciones de plántulas y adultos a través de los 6 loci, se utilizó el índice de diferenciación D propuesto por Jost (2008). Sobre este tema existen varios puntos de vista, en este caso Jost sostiene la idea de que los índices G_{ST} y similares (F_{ST} , R_{ST} , etc) no son índices válidos para calcular la diferenciación genética entre poblaciones. Jost (2008) demuestra matemáticamente que los índices G_{ST} dan valores cercanos a cero cuando la diversidad genética es alta, aunque las poblaciones se encuentren completamente diferenciadas. Es por esta razón que diversos autores (Gerlach *et al.*, 2010); Heller y Siegismund, 2009; Jost, 2009) recomiendan usar el índice de diferenciación D como una verdadera medida de diferenciación. Sin embargo Ryman y Leimar (2011); Whitlock (2011) defienden el uso de índices clásicos como el F_{ST} , R_{ST} o G_{ST} .

El índice D puede ser calculado de la siguiente manera:

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

Dónde:

H_T : heterocigosidad total

H_S : heterocigosidad media de cada población

n : es el número de poblaciones

El cálculo del índice de Jost (D) se lo realizó en el programa SMOGD 1.2.5.

5.5.6. ANÁLISIS DE PATERNIDAD

Los análisis de parentesco utilizan el proceso de exclusión, comparando el genotipo de los candidatos padres con el genotipo de los hijos. Si un error ocurre en uno o más loci uno o más candidatos padres pueden ser excluidos (Marshall *et al.*, 1998). En algunos casos, múltiples candidatos padres permanecen no excluidos, haciendo imposible la identificación de

verdaderos padres. Para prevenir casos en los que el proceso de exclusión puede fallar se ha introducido un análisis de probabilidades (likelihood) o también llamado asignamiento categórico. En este tipo de asignamiento la probabilidad es utilizada para distinguir estadísticamente los candidatos padres no-excluidos utilizando la frecuencia de los alelos de los hijos que podrían haber venido de los padres candidatos, así como la información de candidatos padres homocigotos o heterocigotos (Gerber *et al.*, 2000). Para determinar qué tipo de análisis de paternidad se realizaría se siguió la guía descrita en Jost *et al* (2010).

El análisis de paternidad se llevó a cabo con el programa Cervus 3.5 (Marshall *et al.*, 1998).

Cervus 3.5 trabaja comparando datos genéticos padre-hijo mediante el cálculo de un coeficiente likelihood. La idea principal detrás del análisis likelihood es tomar los datos como punto de partida, para evaluar las hipótesis de estos datos. El likelihood o probabilidad de una hipótesis es siempre evaluada con relación a otra a lo cual se le denomina coeficiente likelihood (Thongthawee *et al.*, 2010).

En el caso del análisis de parentesco los datos son los genotipos de la descendencia, los padres conocidos (si es que se conocen) y uno o más padres candidatos. Por lo tanto se asumen dos preguntas por cada padre candidato: la primera se refiere a si el padre candidato es el verdadero padre y la segunda a que el padre candidato no sea el verdadero padre (Kalinowski *et al.*, 2007).

Por lo tanto, la probabilidad de cada hipótesis, dados los genotipos observados se calcula a partir de la probabilidad de obtener los genotipos observados bajo esa hipótesis. En otras palabras, el coeficiente likelihood es la probabilidad de que el padre candidato sea el verdadero padre, dividido por la probabilidad de que el padre candidato no sea el verdadero padre (Slate *et al.*, 2000).

Los análisis de paternidad muestran un coeficiente likelihood, en forma de puntaje LOD, conocido como logaritmo natural del coeficiente likelihood (Kalinowski *et al.*, 2007).

El puntaje LOD como lo describe Marshal *et al* (2008), es utilizado para identificar el padre más similar. Un puntaje LOD negativo indica desajustes en los candidatos padres en uno o varios loci, indicando menor probabilidad de que sea el verdadero padre. Por otro lado un puntaje LOD igual a cero indica que el padre candidato es igualmente similar al verdadero padre como al no verdadero padre y finalmente un puntaje LOD positivo indica que el candidato padre es más similar al verdadero padre que al no verdadero padre. El verdadero padre casi siempre tiene un puntaje LOD positivo. Después de la evaluación del likelihood de cada posible combinación de padres candidatos para un determinado hijo, el resultado del puntaje LOD producido para cada posible padre es clasificado, y el padre con el puntaje LOD más alto es considerado el padre más similar (Jones y Ardren, 2003). El segundo candidato más similar será el que presente el segundo más alto puntaje LOD.

Se pueden usar adicionalmente dos niveles de confianza para asignar paternidad, relajado y estricto. Por defecto la confianza relajada es del 80% y la confianza estricta es 95% (Marshal, 2010).

Todos los hijos, representados por las plántulas, fueron comparados con los genotipos de los adultos reproductivos encontrados dentro de la parcela, así como en los transectos circundantes a la misma. Para el análisis de paternidad se utilizaron 6 loci (Ob01, Ob22, Ob04, Ob23, Ob11, Ob21) (Montúfar *et al.*, 2006) (Tabla 1).

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE ADN Y DE DATOS

Se obtuvo 259 muestras clasificadas de la siguiente manera: plántulas (199), adultos dentro de la parcela (44) y adultos fuera del área de estudio (16). Se se obtuvo una extracción de ADN exitosa realizando extracciones manuales con el protocolo modificado de Doyle y Doyle, 1987. Se amplificó un total de 6 primers descritos por Montúfar *et al* (2006), de los cuales cuatro son de motivo de repetición simple y dos con motivos de repetición compuestos (Tabla 1). Todos los primers utilizados fueron polimórficos, se obtuvo 1% de datos faltantes, lo que se encuentra dentro del rango normal para realizar análisis genéticos.

6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

6.2.1 DESEQUILIBRIO LIGADO Y EQUILIBRIO HARDY-WEINBERG

El programa entregó un test global (Método de Fisher) para cada par de loci con todas las muestras (plántulas, adultos dentro de la parcela y plántulas fuera de la parcela). Con una significación de 0.05 se obtuvo como resultado que el par de loci Ob21 y Ob01 está en desequilibrio ligado con un valor altamente significativo, y de la misma manera los pares de loci Ob04 - Ob23, y Ob101- Ob23 dieron valores significativos (Tabla 3).

El análisis global (Test de Fisher) indicó que la población de plántulas mostró desviación significativa del equilibrio HW ($P > 0,0001$). En la población de adultos se observó cinco loci en equilibrio Hardy-Weinberg (Ob04, Ob23, Ob22, Ob11, Ob23) (Tabla 4). Estos resultados concuerdan con la naturaleza de una población no panmíctica, en la cual, no todos los individuos tienen la misma probabilidad de apareamiento.

6.2.2 DIVERSIDAD GENÉTICA

El número promedio de alelos por locus fue de 12 alelos para la población de adultos y 18 alelos en la población de plántulas. Tanto en adultos como en plántulas la heterocigosidad observada fue menor a la heterocigosidad esperada. Solo la población de plántulas presentó alelos únicos (4) (Tabla 4). En plántulas la diversidad alélica, que es el promedio de alelos presentes en cada población, fue de $A=9.367$, y el coeficiente de endogamia de esta población también fue el más alto $F_{IS}=0.280$. En cuanto a los adultos se observó una diversidad alélica de $A=7.46$, y una disminución en el índice de fijación; $F_{IS}: 0.14$ (Tabla 4, Tabla 5).

6.2.3. DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Se obtuvo una matriz de datos de las poblaciones de adultos y plántulas, utilizando el índice de diferenciación de Jost (D) con una significación de 0.05. El valor del índice de diferenciación adultos versus plántulas fue $D = 0.228$ (Tabla 6).

6.2.4 ANÁLISIS DE PATERNIDAD

Mediante el programa Cervus 3.5, se realizó el análisis de paternidad con la opción parent pair (sexes unknown), a partir de hijos ($n=199$), con un asignamiento efectivo para 187 plántulas (93.5%), comparando sus genotipos con los de 60 candidatos padres, de los cuales el 98% dieron positivos para la asignación de parentesco (Anexo 5). Los valores críticos delta para el asignamiento de paternidad fueron estimados utilizando una simulación con las siguientes condiciones: 60 candidatos padres, asumiendo que el 90% de los candidatos padres fueron muestreados y genotipados con una tasa de error del 0.01. Adicionalmente se determinó la frecuencia de potenciales hijos por eventos de distancia (Figura 7).

El programa estimó en base al análisis de probabilidades para cada plántula dos posibles padres (Figura 8, Figura 9), se consideró como madre al adulto más cercano a la plántula y

como padre al adulto más distante, este método ha sido reportado en otros estudios (Choo *et al.*, 2012; Sezen *et al.*, 2009).

En base a las distancias de dispersión y los análisis espaciales (Figura 8, Figura 9), se observa que los parentales que aportan la mayor información genética a las plántulas, se encuentran cerca de los extremos de la parcela, incluso se encontraron algunos individuos fuera de la misma (Figura 7).

Para los potenciales padres se observó que las semillas son dispersadas lejos de los mismos (31m a 850m) y análisis de correlación entre distancias de dispersión y número de individuos (plántulas) revelaron una relación significativa ($r = 0.239$; $p = 0.001^{***}$) (Figura 10). Y para las potenciales madres se observó que las correlaciones entre distancia (8m a 570m) y número de individuos (plántulas) no son significativas ($r = 0.078$; $p = 0.292\text{ns}$) (Figura 11).

6.2.5 ANÁLISIS ESPACIAL

Se realizó un test de Mantel con el objetivo de determinar si existe correlación entre la estructura genética y la estructura espacial dentro de las 25ha estudiadas utilizando las matrices de plántulas y adultos. La significación del estadístico se estimó mediante permutaciones (999) con una significancia de $p < 0,05$. Se obtuvo un coeficiente de correlación con un valor de $r = 0.019$ y con una significancia de $p = 0.085$.

7. DISCUSIÓN

7.1 DINÁMICA POBLACIONAL DE *O. bataua*

La población de *Oenocarpus bataua* en Yasuní tiene altos valores de diversidad genética e índices de endogamia (Tabla 5). Las desviaciones significativas en el equilibrio Hardy Weinberg sugieren que la selección natural, deriva génica, migración entre otros, afectan el equilibrio de las poblaciones estudiadas.

Estudios comparativos de estructura genética, reportan para adultos *O. bataua* en tres poblaciones de la Amazonía peruana alta diversidad genética y bajos índices de endogamia (Tabla 7). En las poblaciones de Yasuní (plántulas y adultos) los valores encontrados de diversidad y endogamia son similares a las áreas más lejanas reportadas para la amazonía peruana (Montufar y Pintaud, 2006). Debido a que las poblaciones silvestres de palmeras en la Amazonía no presentan una estructuración genética definida, se sugiere que no existen limitaciones en el flujo génico que favorezcan la divergencia molecular entre poblaciones por la carencia de barreras biogeográficas a lo largo de la cuenca amazónica.

Otro ejemplo, es un estudio realizado en el bosque del Chocó ecuatoriano con *Oenocarpus bataua* (Karubian, no publicado). Se registró una diversidad alélica menor a la observada en los estudios de la amazonía, pero con un índice de endogamia negativo (Tabla 7). Este índice de endogamia negativo, contrario a nuestros resultados (Tabla 5), indica un exceso de individuos heterocigotos con respecto a lo esperado bajo equilibrio HW.

La alta diversidad alélica encontrada en las poblaciones de Yasuní (plántulas y adultos), probablemente está directamente relacionada con la salud ecológica de la zona, la cual determina la dinámica del flujo génico (Wills *et al.*, 2006), y por la heterogeneidad a nivel de microhábitat en el área de estudio (Svenning, 2001; Burhan y Graham, 1999).

En trabajos realizados con otras especies de palmas como *Ceroxylon echinulatum* (Espinoza, 2010) y *Prestoea acuminata* (Escobar, 2011) se observaron índices de diversidad alélica más bajos a los reportados para las poblaciones de Yasuní y con índices de endogamia variables asociados al estado de conservación del bosque. En las poblaciones de Yasuní, existe mayor diversidad alélica comparada con los estudios de otras especies de palmas en los Andes y la amazonía. La variabilidad de los resultados, en parte se explica por las diferencias en diseños de muestreo, número de loci de microsatélites, tamaños del área de estudio, y el estado de conservación del bosque.

En las poblaciones de adultos y plántulas de *O. bataua* en Yasuní, se observó que la estructuración genética no está relacionada con variables espaciales ($r = 0.019$, $p = 0.085\text{ns}$), no existe ningún patrón espacial asociado a la distribución de alelos en la escala estudiada, probablemente si se aumenta el área de estudio los resultados indicarían algún tipo de correlación. Tomando en cuenta que en el área de estudio existen dos colinas y un valle interno, se sugiere que la topografía de la parcela no influye en la distribución espacial de los alelos, los cuales se distribuyen libremente sin ninguna restricción física en la zona.

7.2 ESTRUCTURACIÓN TEMPORAL

Los resultados del presente estudio muestran que las poblaciones de plántulas tienen mayor diversidad alélica que los adultos (Tabla 4, Tabla 5). El índice de Jost (2008), también sugiere un nivel de diferenciación significativo entre plántulas y adultos (Tabla 6). Estos resultados pueden ser explicados por dos hipótesis:

(i) La primera hipótesis relaciona los resultados obtenidos con el hecho de que las poblaciones de plántulas no están sometidas a selección natural y existe mayor cantidad de alelos y variables índices de endogamia (Primack y Kang, 1989; Lenormand, 2002). Mientras

que, las poblaciones de adultos ya están sujetas a la selección natural y consecuentemente se espera una diversidad genética seleccionada y menor cantidad de alelos (Eguiarte *et al.*, 1992). Es decir, las plántulas de Yasuní presentan mayor diversidad alélica debido a que todavía no se ha reducido el pool génico como consecuencia de la selección natural, que por su parte ya ha tenido un apreciable efecto en los adultos de *O. bataua* estudiados.

Estudios han documentado para poblaciones de árboles tropicales (Gaiotto *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2004; 2008) mayor diversidad genética y tasas de endogamia (Fis) positivas y significativas en etapas tempranas del desarrollo. A medida que los individuos son reclutados y establecidos por la dinámica forestal esta estimación tiende a no ser significativa e incluso a mostrar valores negativos debido a la selección que opera en contra de los individuos endogámicos después del establecimiento de las plántulas. Se sugiere que nuestros resultados mantienen esta tendencia, que ha sido atribuida a la selección en contra de los individuos homocigotos (Eguiarte *et al.*, 1992; Gaiotto *et al.*, 1997).

Gaiotto *et al* (2003) en su estudio realizado en Brazil reportó la selección en contra de los individuos endogámicos, con poblaciones de *Euterpe edulis*, y atribuyó sus resultados al predominante sistema de apareamiento cruzado con una baja pero significativa cantidad de autofecundación sin endogamia biparental detectada. Otro estudio Eguiarte (1992) mostró para *Astrocaryum mexicanum* este fenómeno en un estudio realizado en México. Se observó que la estructura genética de *A. mexicanum* parece ser el resultado de un equilibrio entre polinización cruzada y el movimiento de polen a largas distancias por polinizadores (insectos) que reducen la diferenciación genética entre las áreas estudiadas. Ellos sugieren que la selección natural podría funcionar durante el largo ciclo de vida de esta palma, aumentando la diferenciación genética entre sitios y la proporción de individuos heterocigotos.

Para otras especies de plantas la selección en contra de individuos homocigotos también ha sido documentada. En un estudio realizado en Manaus (Santos *et al.*, 2004; 2008) se registró mayor diversidad genética en plántulas y árboles jóvenes que en adultos del palo de rosa (*Aniba rosaeodora*), lo que sugiere una intensa selección en las primeras etapas de desarrollo. Aunque no hay consenso sobre su sistema de apareamiento la tasa de fecundación cruzada es alta y similar a otras especies de Lauraceae lo que permitió explicar los altos niveles de diversidad genética reportados en su estudio.

(ii) La segunda hipótesis sugiere que los disturbios, al igual que los procesos de dispersión afectan la diversidad genética y ocurrencia de palmas en bosques tropicales (Clark *et al.*, 1995; Boll *et al.*, 2005). Esta hipótesis es de particular importancia debido a que la parcela estudiada se encuentra al borde de la carretera Maxius, y el impacto de este disturbio y efecto de borde no ha sido estudiado (Benitez, 2001; Benitez y Martinez, 2003). Goosem (1997), reportó que el efecto de borde puede penetrar 50 m para aves, 100 m para los efectos microclimáticos y 300 m para insectos. Baez y Balsev (2007), evaluaron las consecuencias del efecto de borde en las poblaciones de palmeras en el occidente del Ecuador, este estudio sugiere que el desbroce de vegetación puede afectar hasta los 100m o más dependiendo de la especie. En *O. bataua* la diferencia generacional es mayor a 50 años (Miller, 2002), pero el impacto del disturbio en el flujo génico es inmediato. Una vez abierta una carretera se reducen las poblaciones de insectos, consecuentemente se reducen las posibilidades de polinización y cuando las semillas, producto del más reciente evento de polinización son fecundadas el impacto del flujo génico ya está plasmado.

Las consecuencias del efecto de borde causado por la apertura de la carretera pueden diferenciarse en efectos abióticos (que implican cambios ambientales en el bosque causados por la proximidad a la carretera), efectos biológicos directos (que ocurren porque las especies

demuestran diversas respuestas al hábitat del borde) y efectos biológicos indirectos (que ocurren porque los procesos ecológicos como la depredación, la polinización y la dispersión de semillas se modifican debido a la proximidad del borde) (Murcia 1995).

Los efectos biológicos indirectos son los que influyen en la tasa de flujo génico de plantas. Estudios sobre disturbios (Laurance 1999, Guariguata *et al.*, 2002; Janzen y Vásquez-Yanes, 1991) han predicho, que el efecto de borde en el caso de la dispersión, polinización de semillas y abundancia de dispersores, limita el flujo génico en las poblaciones silvestres. En contraste a estos trabajos, otros autores demostraron efectos contrarios a lo esperado; Ghazoul y McLeish (2001) relacionaron el éxito relativo de la polinización de *Anacardium excelsum* (Anacardiaceae) con el tamaño del fragmento donde estuvieron ubicados los individuos, y con el cambio en los hábitos de forrajeo de sus polinizadores, abejas del género *Trigona*. Demostraron que los disturbios no siempre causan reducción en la habilidad reproductiva de los árboles en bosques tropicales. Cascante *et al.* (2002) no encontraron diferencias en el éxito reproductivo de individuos aislados (producto del disturbio) de *Samanea saman* (Fabaceae) respecto a individuos ubicados en poblaciones continuas (no fragmentadas) en el bosque de Costa Rica. Sin embargo, observaron una reducción de la diversidad genética de la progenie proveniente de los individuos aislados, y un aumento en el coeficiente de endogamia. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio, en donde a pesar de que las poblaciones de plántulas presentan mayor diversidad su índice de endogamia indica esta tendencia significativa a la homocigocis de los individuos.

Aguilar *et al.*, (2006) concluyeron que el grado de susceptibilidad de una especie a ser afectada por los disturbios está determinado principalmente por su sistema de compatibilidad. Los árboles tropicales son frecuentemente auto-incompatibles y dependientes del mutualismo con animales para la polinización cruzada y dispersión de semillas (Bawa *et al.*, 1985) por lo

que son más sensibles a los efectos de los disturbios y que se expresan en la alteración de la variabilidad genética y en altos niveles de endogamia (Fuchs *et al.*, 2003). El mismo patrón es observado en palmas, las cuales son auto-incompatibles, y en particular *O. bataua* que es protándrica y 100% dependiente de la polinización por insectos y dispersión por animales.

En el presente estudio no se demuestra una evidencia absoluta que sustente a los disturbios como un factor que está influenciando de manera fuerte o débil la dinámica de flujo génico. Cada especie responde de diferente manera a los disturbios en base a su estrategia reproductiva. Si bien al abrir una carretera el área afectada de modo directo puede ser relativamente pequeña, las consecuencias del efecto de borde se presentarán en las inmediaciones o borde de la vía, donde se crearán condiciones con mayor temperatura, menor humedad, mayor radiación y mayor susceptibilidad al viento (Murcia, 1995). Estas condiciones son determinantes en el comportamiento de los dispersores e influye en niveles de diversidad como en los altos índices de endogamia reportados en el presente estudio.

7.3 DISPERSIÓN DE SEMILLAS: Hipótesis de Janzen y Connell

En estudios de asignamiento de paternidad cuando se identifica a ambos padres, generalmente uno de ellos se encuentra cerca de la planta juvenil y el otro padre está distante (Gaiotto *et al.*, 2003). El mismo patrón se observó en nuestro estudio, sugiriendo que el polen proviene de largas distancias, mientras que la mayoría de semillas germina cerca de la planta madre.

La predicción de la mortalidad dependiente de la distancia de la hipótesis de Janzen y Connell no fue confirmada con los datos examinados en nuestro estudio. Este modelo menciona que las plántulas dispersadas lejos de los árboles parentales tienen mayor tasa de supervivencia, ya que los individuos que permanecen cerca de la corona de los adultos

reproductivos son más propensos a patógenos y a predadores que concentran sus actividades cerca de los mismos.

En el presente estudio se observó que las semillas son dispersadas lejos de sus potenciales padres mostrando una correlación entre distancias de dispersión y número de individuos (plántulas) significativa (Figura 10). Sin embargo, la hipótesis Janzen y Connell se aplica para las potenciales madres, en donde las correlaciones entre distancia y número de individuos (plántulas) no son significativas (Figura 11). Es decir, no existe una relación significativa entre el aumento de la distancia desde las potenciales madres y la cantidad de plántulas que se esperaría observar de ser comprobada la hipótesis. Nuestro estudio revela variaciones a nivel de distancias, pero no corresponden con la tendencia postulada por Janzen (1991) y Connell (1979), se sugiere que la dispersión no parece imponer un grado significativo de separación desde los padres maternales como lo predice el modelo.

Aguiar y Sala, (1994) y Blundell y Peart, (1998) han documentado que no se puede generalizar que a mayor distancia desde los parentales mejora la supervivencia de las semillas, aunque hay algunos indicios de que las plántulas pueden verse beneficiadas si se encuentran alejadas de los parentales. Sin embargo, los casos individuales que concuerdan con la hipótesis, parecen ser casos especiales que se equilibran con los casos en que la hipótesis no es compatible (Burkey, 2004). No se puede afirmar que la distancia hacia los padres sea el único factor ecológico importante para el reclutamiento de las poblaciones de palmas, ya que, otros mecanismos podrían operar para favorecer el reclutamiento y establecimiento de plántulas (Hyatt *et al.*, 2003).

En Hyatt *et al.*, (2003) examinaron la hipótesis de Janzen y Connell a través de un número amplio de especies de árboles en diferentes tipos de bosques. No se encontró apoyo a la hipótesis y sugieren que se deben realizar más pruebas para saber si es realmente un

mecanismo de diversidad. Sin embargo también se encontró que a mayor distancia de los padres se reduce ligeramente la supervivencia en los entornos de clima templado, en contraste con las zonas tropicales, donde hay una fuerte evidencia de la hipótesis en plántulas que en semillas. Finalmente concluyen que el aumento de la supervivencia de propágulos con la distancia a los parentales puede ser importante para la biología de las poblaciones de especies particulares, pero no es un fenómeno generalizado en todas las comunidades de plantas (Hubbell *et al.*, 1999).

La distancia media de dispersión de semillas por animales depende de la especie de planta y del agente de dispersión (Grivet *et al.*, 2005). Es por esta razón que existen registros de distancias de 22 km como las reportadas por Gaiotto y colaboradores (2003) en *Euterpe edulis*, que tiene semillas más pequeñas principalmente dispersadas por aves. Sin embargo, se han observado distancias más cortas como las reportadas para *Iriartea deltoidea* que presenta semillas más grandes y dispersadas por frugívoros, y donde más del 70 % de plántulas fueron dispersadas 50 m de los árboles padres (Sezen *et al.*, 2009). Karubian *et al* (2010) reportaron cómo la dispersión mediada por un ave frugívora afecta el flujo génico y la estructura genética de *Oenocarpus bataua*. Se encontraron distancias de dispersión de 300m en el área central del lek, similares a las registradas en este estudio.

En nuestro estudio los patrones observados indican que probablemente la distribución de plántulas y la estructura genética espacial se encuentran en gran parte determinadas por el comportamiento de los dispersores de semillas y no únicamente por la proximidad espacial a los árboles padres. En este sentido, la naturaleza estocástica de la dispersión mediada por animales y la estructura genética resultante es la clave para la comprensión de cómo la dispersión por vertebrados afecta a la reproducción y a la estructura genética de las poblaciones locales de palmas.

8. CONCLUSIONES

Estos resultados demuestran que estudios de dispersión de genes son fundamentales para aclarar aspectos relacionados con la conservación, ya que proporcionan medidas precisas de cómo se estructura la diversidad genética y las variaciones temporal y espacial dentro de las poblaciones.

Estudios sobre asignamiento de paternidad relacionados a la habilidad reproductiva de plantas, son importantes para la conservación de especies vulnerables. Por ejemplo, para aclarar aspectos como los umbrales en cuanto a distancia y modificación de habitat que realmente aíslan a un individuo del intercambio genético y cuál es la magnitud de la disminución de rasgos considerados como favorables en las semillas producidas en ambientes disturbados y como afectaría esto a su progenie.

El uso de marcadores genéticos en un diseño experimental que contemple estudios en diferentes ambientes o hábitas puede ser más útil para responder estas preguntas sobre la salud genética de la población, complementada con estudios de las comunidades de polinizadores y dispersores.

9. LITERATURA CITADA

Aguilar, M. R. y Sala, O. E. 1994. Competition, facilitation, seed distribution and the origin of patches in a Patagonian steppe. *Oikos* 70: 26–34.

Aguilar, R., Ashworth, L., Galetto, L., y Aizen, M.A. 2006. Plant reproductive susceptibility to habitat fragmentation: review and synthesis through a meta-analysis. *Ecol Lett* 9: 968-980.

Alleaume-Benharira, M., Pen, I.R., Ronce, O. 2006. Geographical patterns of adaptation within a species' range: interaction between drift and gene flow. *Journal of Evolutionary Biology* 19:203-215.

Ashley, M. V. 2010. Plant Parentage, Pollination, and Dispersal: How DNA Microsatellites Have Altered the Landscape. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29: 148–161.

Athens, J. 1997. Paleoambiente del Oriente ecuatoriano: resultados preliminares de columnas de sedimentos procedentes de humedales. *Fronteras de la ciencia* 1: 15–32.

Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York.

Baez, S. y Balslev, H. 2007. Edge effects on palms diversity in rain forest fragments in wester Ecuador. *Biodivers Conserv* 16: 2201-2211.

Bawa, K. S., Perry, D.R., y Beach, J.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I Sexual systems and incompatibility mechanisms. *Am J Bot* 72: 331-345

Balick, M. 1979. Amazonian Oil Palms of Promise: a Survey. *Economic Botany* 33(1):11–28.

Balick, M. J. 1986. Systematics and Economic Botany of the *Oenocarpus–Jessenia* (Palmae) complex. *Advances in Economic Botany* 3:1–140

Balick, M. J. 1992. *Jessenia y Oenocarpus*: palmas aceiteras neotropicales dignas de ser domesticadas. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Roma, Italia.

Balick, M. J., Gershoff, S.N. 1981. Nutritional evaluation of the *Jessenia bataua* palm: source of high quality protein and oil from Tropical America. *Economic Botany* 35:261–27.

Benitez, J. 2001. Regeneration in Tropical rainforest fragments. In Bierregaard, R., Gascon, C., Lovejoy, T., Mesquita, R. (eds). *Lessons from Amazonia: the ecology and conservation of a fragmented forest*. New Haven. Yale University, pp 136-145.

Benítez, J. y Martínez, M. 2003. Impact of forest fragmentation on understory plant species richness in Amazonia. *Conservation Biology* 17: 389-400.

Blundell, A. G. y Peart, D. R. 1998. Distance-dependence in herbivory and foliar condition for juvenile *Shorea* trees in Bornean dipterocarp rain forest. *Oecologia* 117: 151–160.

Boll, T., Svenning, J-C., Vormisto, J., Normand, S., Grandez, C., y Balslev, H. 2005. Spatial distribution and environmental preferences of the piassaba palm *Aphandra natalia* (Arecaceae) along the Pastaza and Urituyacu rivers in Peru. *Forest Ecology and Management* 213: 175-183.

Borchsenius, F., Borgtoft-Pedersen, H., y Balslev, H. 1998. Manual to the palms of Ecuador. AAU Reports 37, Dept. of Systematic Botany, University of Aarhus.

Borgtoft-Pedersen, H. y Balslev H. 1993. Palmas útiles. Especies ecuatorianas para agroforestería y extractivismo. Ediciones ABYA-YALA. Quito, Ecuador.

Borgtoft-Pedersen, H. y Balslev, H. 1990. Ecuatorean palms for agroforestry. AAU Reports 23. Botanical Institute, Aarhus University, Denmark.

Bruford, M.W. y Wayne, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics & Development* 3: 939–943.

Burczyk, J., Adams, W.T., Birkes, D.S., Chybicki, I.J. 2006. Using genetic markers to directly estimate gene flow and reproductive success parameters in plants on the basis of naturally regenerated seedlings. *Genetics* 173:363-372.

Burkey, T. V. 1994. Tropical tree species-diversity: a test of the Janzen-Connell model. *Oecologia* 97: 533–540.

Burnham, R.J., y Graham, A. 1999. The history of Neotropical vegetation: New developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 86:546-589.

Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J., y Fuchs, E. 2002. Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conserv Biol* 16: 137-147.

Castaño, N., Cárdenas, D., y Otavo, E. 2007. Ecología, aprovechamiento y manejo sostenible de nueve especies de plantas del departamento del Amazonas, generadoras de productos maderables y no maderables. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas – Sinchi-. Corporación para el Desarrollo Sostenible del Sur de la Amazonia (CORPOAMAZONIA). Bogotá, Colombia.

Chase, M.R., Kesseli, R., y Bawa, K.S. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83:51–57.

Chesson, P.L, y Warner, R.R.1981. Environmental variability promotes coexistence in lottery competitive systems. *Am Nat.*117: 923-943

Choo, J., Juenger, T. y Simpson, B. 2012. Consequences of frugivore-mediated seed dispersal for the spatial and genetic structures of a neotropical palm. *Molecular Ecology* 21: 1019–1031.

Clark, D.A. y Clark, D.B. 1984. Spacing dynamics of a tropical rain forest tree: evaluation of the Janzen-Connell model. *Am Nat* 124(6): 769-788.

Clark, A. G. 1990. Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution* 7: 111-122.

Clark, D. A., Clark, D. B., Sandoval, M. R., y Castro, C. M. 1995. Edaphic and human effects on landscape-scale distributions of tropical rainforest palms. *Ecology* 76 (8): 2581-2594.

Clark, J. S., Macklin, E., y Wood, L. 1998. Stages and spatial scales of recruitment limitation in southern Appalachian forests. *Ecological Monographs* 68: 213-235.

Condit, R., Hubbell, S.P., y Foster, R.B. 1992. Recruitment near conspecific adults and the maintenance of tree and shrub diversity in a neotropical forest. *Am Nat* 140:261-286.

Connell, J. H. 1971. On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and in rain forest trees. Pages 298-310 in P. J. den Boer and G. R. Gradwell, eds. *Dynamics of populations. Proceedings of the Advanced Study Institute on Dynamics of numbers in populations*, Oosterbeek, 1970. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen.

Connell, J.H. 1979. Tropical rain forests and coral reefs as open non equilibrium systems. In: Anderson, R.M., Turner, B.D., Turner, L.R. (eds) *Population dynamics*. Blackwell Scientific, Oxford, pp 141-163.

Crawford, N.G. 2010. SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources* 10, 556-557.

Crow, J. F. y Kimura, M. 1970. *An Introduction to population genetics theory*. Harper and Row Publishers Inc. New York.

Dayanandan, S., Dole, J., Bawa, K., y Kesseli, R. 1999. Population structure delineated with microsatellite markers in fragmented populations of a tropical tree, *Carapa guianensis* (Meliaceae). *Molecular Ecology* 8:1585-1592.

Dick, C.W., Etchelecu, G., y Austerlitz, F. 2003. Pollen dispersal of tropical trees (*Dinizia excelsa*: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. *Molecular Ecology* 12: 753-764.

Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W. J., Harley, M., y Lewis, C. 2008. *Genera Palmarum*. The evolution and classification of palms. Royal Botanic Gardens. Kew, UK.

Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M., y Lewis, C. 2005. A new Phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bulletin* 60 (4): 559–569.

Eguiarte, L. E., Perez-Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69 217-228.

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.

Escobar, S. 2011. Estructura genética de poblaciones transandinas de *Prestoea acuminata* (Willd.) H.E. Moore en los Andes septentrionales de Ecuador. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

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

Espinoza, S. 2010. Variación histórica y espacial de la estructura genética de dos poblaciones de *Ceroxylon echinulatum* Galeano (palma de ramos, Arecaceae) bajo diferentes niveles de impacto humano. Tesis de licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.

ESRI. 2009. ArcGIS Explorer (programa de ordenador). New York: ESRI. [Usado: Agosto- Octubre 20012]. Disponible en: <http://www.esri.com/software/arcgis/explorer/index.html>.

Estoup, A. y Cornuet, J. M. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. En: *Microsatellites Evolution and Applications* (D. Goldstein y C. Schlotterer eds.) pp.49-65. Oxford University Press, New York, U.S.A.

Felsenstein, J. 2004. *Inferring phylogenies*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd.

Fuchs, E.J., Lobo, J.A., y Quesada, M. 2003. Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. *Conserv Biol* 17: 149-157.

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

Gerber, S., Mariette, S., Streiff, R., Bodénès, C., y Kremer, A. 2000. Comparison of microsatellites and amplified fragment length polymorphism markers for parentage analysis. *Molecular Ecology* 9:1037-1048.

Ghazoul, J. y McLeish, M. 2001. Reproductive ecology of tropical forest trees in logged and fragmented habitats in Thailand and Costa Rica. *Plant Ecol* 153: 335-345.

Gibson, J.P.; Wheelwright, N.T.; Nathaniel, T. 1996. Mating system dynamics of *Ocotea tenera* (Lauraceae) a gynodioecious tropical tree. *Am. J. Bot* 83(7): 890-894.

Gillespie, J. H. 1998. *Population genetics a concise guide*. Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore.

Goldstein, B. D. y Schlotterer, C. 1999. *Microsatellite evolution and applications*. Oxford University Press, New York U.S.A.

Goosem, M. 1997. Internal fragmentation: the effects of roads, highways and powerline clearings on movements and mortality of rainforest vertebrates. pp. 241-255. En: Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities. W. F. Laurance y R. Bierregard junior (eds). University of Chicago Press, Chicago

Griffiths, A.J.F., Miller, J.H. Suzuki, D.T. Lewontin, R.C. y Gelbart, W.M. 1996. An Introduction to Genetic Analysis (6th edn.). Freeman and Co., New York. U.S.A.

Grivet, D., Smouse, P.E., y Sork, V.L. 2005. A novel approach to an old problem: tracking dispersed seeds. *Molecular Ecology* 14:3585-3595.

Gross, D. S. y Garrad, W. T. 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annual Review of Biochemistry* 57: 159-197.

Grubb, P. 1977. The maintenance of species richness in plant communities: The importance of the regeneration niche. *Biol Rev.* 53:107-145.

Guariguata, M., Arias-Le Claire, H., y Jones, G. 2002. Tree seed fate in a logged and fragmented forest landscape, Northeastern Costa Rica. *Biotropica* 34(3): 405-415.

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

Gupta, M., Chyi, Y.S. Romero-Severson, J. y Own, J.L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical Applied Genetics* 89:998-1006.

Haldane, J. B. S. 1954. An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* 52: 631-635.

Hamilton, M. B. 1999. Tropical tree gene flow and seed dispersal. *Nature* 401: 129-130.

Hamada, H., Seidman, M., Howard, B. H. y Gordman, C M. 1984. Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) poly(dA-dC) sequence. *Molecular. Cell biology* 4: 2622-2630.

- Hardy, H.G. 1908. Mendelian proportions in a mixed population. *Science* 28:49–50
- Henderson, A. 2002. *Evolution and ecology of palms*. The New York Botanical Garden Press.
- Henderson, A., Galeano, G. y Bernal, R. 1995. *Field guide to the palms of the Americas*. Princeton University Press.
- Hillis, D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 23-42.
- Howe, H.F. y Smallwood, J. 1982. Ecology of seed dispersal. *Annual Rev Ecol Syst* 13: 201-228.
- Hubbell, S. P., Foster, R. B., O'Brien, S. T., Harms, K. E., Condit, R., Wechsler, B., Wright, S. J. y Lao, S. 1999. Light-gap disturbances, recruitment limitation, and tree diversity in a neotropical forest. *Science* 283: 554–557.
- Janzen, D. H. 1970. Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *Am. Nat.* 104:501- 528
- Janzen, D., y Vazquez-Yanes, C. 1991. Aspects of tropical seed ecology of relevance to management of tropical forested wildlands, In Gomez, A., Whitmore, T., Hadley, M. (eds). *Rain forest regeneration and management*. Man and Biosphere Program, pp. 137-157.
- Jones, A. y Ardren, W. 2003. Methodology of parentage analysis in natural populations. *Molecular ecology* 12: 2511-2523.
- Jones, A., Clayton, M., Small, K., Paczolt, A., y Ratterman, N. 2010. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources* 10: 6–30.
- Kalinowski, S., Taper, M. y Marshall, T. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16:1099-1106.

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

Kimura, M. y Ohta, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75: 2868-2872.

Kimura, M. y Crow, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

Laurance, W. y Bierregaard, R. 1997. *Tropical forest remnants: ecology, management, and conservation of fragmented communities*. Chicago, University of Chicago, pp 616.

Laurance, W. F., Gascon, C., y Rankin-de Merona, J. 1999. Predicting effects of habitat destruction on plant communities: a test of a model using Amazonian trees. *Ecol Appl* 9: 548-554.

Lenormand, T. 2002. Gene flow and the limits on the natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 183-189.

Litt, M. y Luty, J. A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*. 44: 397-401.

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

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

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.

Manly, B.F. 1997. Randomization and Monte Carlo methods in biology. Chapman & Hall, London.

Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209-220.

Marshall, T., Slate, J., Kruuk, L., y Pemberton, J. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Marshall, T. 2010. Cervus. Field Genetics Limited.

Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L., y Pemberton, J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.

Miller, C. 2002. Fruit production of the unguurahua palm (*Oenocarpus bataua* subsp. *bataua*, Arecaceae) in an indigenous managed reserve. *Economic botany* 56: 165-176.

Miranda, J., Montaña, F.; Zenteno, F.; Nina, H., y Mercado, J. 2008. El majo (*Oenocarpus bataua*): una alternativa al biocomercio en Bolivia. Trópico PNBS FAN. La Paz, Bolivia.

Montúfar, R., Maria, C., Pham, J.L., y Pintaud, J.C. 2006. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). *Molecular Ecology Notes* 7, 75–78.

Montúfar, R. y Pintaud, J.C. 2006. Variation in species composition, abundance and microhabitat preferences among western Amazonian *terra firme* palm communities. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151 : 127-140.

Montúfar, R. 2007, Structure génétique, biochimique, morphologique et écologique de *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): perspectives pour la valorisation durable d' une ressource forestière néotropicale. Tesis de doctorado. École Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

Montúfar, R., Laffargue, A., Pintaud, J. C., Hamon, S., Avallone, S., y Dussert, S. 2010. *Oenocarpus bataua* Mart. (Arecaceae): Rediscovering a Source of High Oleic Vegetable Oil from Amazonia. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87:167–172.

Moore, S. S., Sargeant, L. L., King, T. J., Mattik, J. S., Georges, M. y Hetzel, J. S. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellite among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primers pairs in closely related species. *Genomics* 10: 654-660.

Moraes, R. M. 1996. Bases para el manejo sostenible de palmeras nativas de Bolivia. Ministerio Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente/Tratado de Cooperación Amazónica, La Paz, Bolivia.

Moraes, R. M. 2004. Flora de palmeras de Bolivia. Herbario Nacional de Bolivia, Instituto de Ecología, Carrera de Biología, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Murcia, C. 1995. Edge effects in fragmented forests: implications for conservation. *Trends Ecology Evolution* 10: 58-62.

Murphy, K. E. y Stringer, J. R. 1986. RecA independent recombination of poly [d(GT)-d(CA)] in pBR322. *Nucleic Acids Research* 14 (18): 7325-7340.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.

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

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

Norheim, T. 1996. Uso y aprovechamiento tradicional de productos forestales no maderables en la región andina. Probona, La Paz, Bolivia.

Núñez, L. A., Bernal, R., y Knudsen, J. 2005. Diurnal palm pollination by my tropine beetles: is it weather-related? *Plant Systematics and Evolution* 208:187–196

Núñez, L. y Rojas, R. 2008. Biología reproductiva y ecología de la polinización de la palma milpesos *Oenocarpus bataua* en los Andes colombianos. *Caldasia* 30:101-125

Ovesná, J., Poláková, K. y Leiová, L. 2002. DNA analyses and their applications in plant breeding. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 38:29-40.

Pedersen, H. y Balslev, H. 1992. The Economic Botany of Ecuadorian Palms. En: Sustainable Harvest and Marketing of 85 Rain Forest Products (M. Plotkin y L. Famolare, eds). Conservation International Washington D.C., USA. *Review of Ecology and Systematics* 18:23-42.

Primack, R. y Kang, H. 1989. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20:367-96.

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

-----1995b. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1283–1286.

Ritland, K. 2002. Extensions of models for the estimation of mating systems using an independent loci. *Heredity* 88:221-228.

Robertson, A. y Hill, W. G. 1984. Deviations from Hardy-Weinberg proportions: sampling variances and use in estimation of inbreeding coefficients. *Genetics* 107: 703-718.

Santos, R. P., Spironello, W. y Sampaio, R. 2008. Genetic diversity in rosewood saplings (*Aniba rosaeodora* ducke, Lauraceae): an ecological approach. *Acta Amazónica* 38 707-714.

Santos, R.P. 2004, Avaliação da diversidade genética de populações naturais de Pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) por meio de marcadores moleculares RAPD. Dissertação de Mestrado, Inpaufam, Manaus. 81.

Sezen, U. U., Chazdon, R. L., y Holsinger, K. E. 2007 Multigenerational genetic analysis of tropical second-growth forest regeneration in an abundant canopy palm. *Ecology* 88: 3065–3075.

Sezen, U. U., Chazdon, R.L., y Holsinger, K.E. 2005. Genetic consequences of tropical second growth forest regeneration. *Science* 307- 891.

Sezen, U. U., Robin, L. Ch., y Kent, E. H. 2009. Proximity is not a proxy for parentage in an animal-dispersed Neotropical canopy palm. *Proceedings of the Royal Society* 276: 2037-2044.

Sist, P. y Puig, H. 1987. Régénération, dy bamique des populations et dis sémination d'un palmier de Guyane Française: *Jessenia bataua* (Mart.) Burret subsp. *Oligocarpa* (Griseb & Wendl.) Balick. *Adansonia* 3:317–336.

Slavov, G.T., Howe, G.T., Gyaourova, A.V., Birkes, D.S., y Adams, W.T. 2005. Estimating pollen flow using SSR markers and paternity exclusion: accounting for mistyping. *Molecular Ecology* 14:3109-3121.

Slate, J., Marshall, T.C. y Pemberton, J.M. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801-808.

Slate, J., Marshall, T.C., y Pemberton, J.M. 2000. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. *Molecular Ecology* 9: 801-808.

Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.

Stallings, R. L., Ford, A. F., Nelson, D., Torney, D. C., Hildebrand, C. E., y Moyzis, R. K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics* 10:807-815.

Svenning, J.C. 2001. On the role of micro environmental heterogeneity in the ecology and diversification of Neotropical rainforest palms (Arecaceae). *Botanical Review* 67:1-53

Swamy, V. y Terborgh, J.W. 2010. Distance-responsive natural enemies strongly influence seedling establishment patterns of multiple species in an Amazonian rain forest. *Journal of Ecology* 98: 1096–1107.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphism markers. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.

Terborgh, J. 1983. Five new world primates. Princeton University Press, Princeton, Nueva Jersey.

Thongthawee, S., Tittinutchanon, P. y Volckaert, H. 2010. Microsatellites for parentage analysis in an oil palm breeding population. *Thai Journal of Genetics* 3: 172-181.

Tilman, D. 1982. Resource competition and community structure. Princeton University Press, Princeton.

Trénel, P., Hansen, M., Normand, S., y Borchsenius, F. 2008. Landscape genetics, historical isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm *Ceroxylon equinulatum* (Arecaceae). *Molecular Ecology*, 17: 3528–3540.

Uhl, N. y Moore, H. 1977. Correlations of inflorescence, flower structure, and floral anatomy with pollination in some palms. *Biotropica* 9:170-190.

Valencia, R., Balslev, H., y Paz y Miño, G. 1994. High tree alpha diversity in Amazonian Ecuador. *Biodivers Conserv* 3:21–28

Weinberg, W. 1908. On the demonstration of heredity in man. En: *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, Sunderland, Mass.

Weir, B. y Cockerham, 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.

Wills, C., Harms, K.E., Condit, R., King, D., Thompson, J., He, F.L., Muller-Landau, H.C., Ashton, P., Losos, E., Comita, L., Hubbell, S., Lafrankie, J., Bunyavejchewin, S., Dattaraja, H.S., Davies, S., Esufali, S., Foster, R., Gunatilleke, N., Gunatilleke, S., Hall, P., Itoh, A., John, R., Kiratiprayoon, S., De Lao, S.L., Massa, M., Nath, C., Noor, M.N.S., Kassim, A.R., Sukumar, R., Suresh, H.S., Sun, I.F., Tan, S., Yamakura, T., y Zimmerman, E. 2006. Nonrandom processes maintain diversity in tropical forests. *Science* 311, 527-531.

Wright, S. 1921. Correlation and causation. *Journal of Agricultural Research*. 20: 557-585.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*. 28: 114-138.

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

Young, A., Boyle, T., Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11:413-418.

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

Zuluaga, R. G. 1997. Etnomedicina de las palmas tropicales. V Seminario-Taller Internacional “sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria” y primer “Seminario Internacional Palmas en Sistemas de Producción Agropecuaria para el Trópico”. Fundación CIPAV. Cali, Colombia.

10. FIGURAS

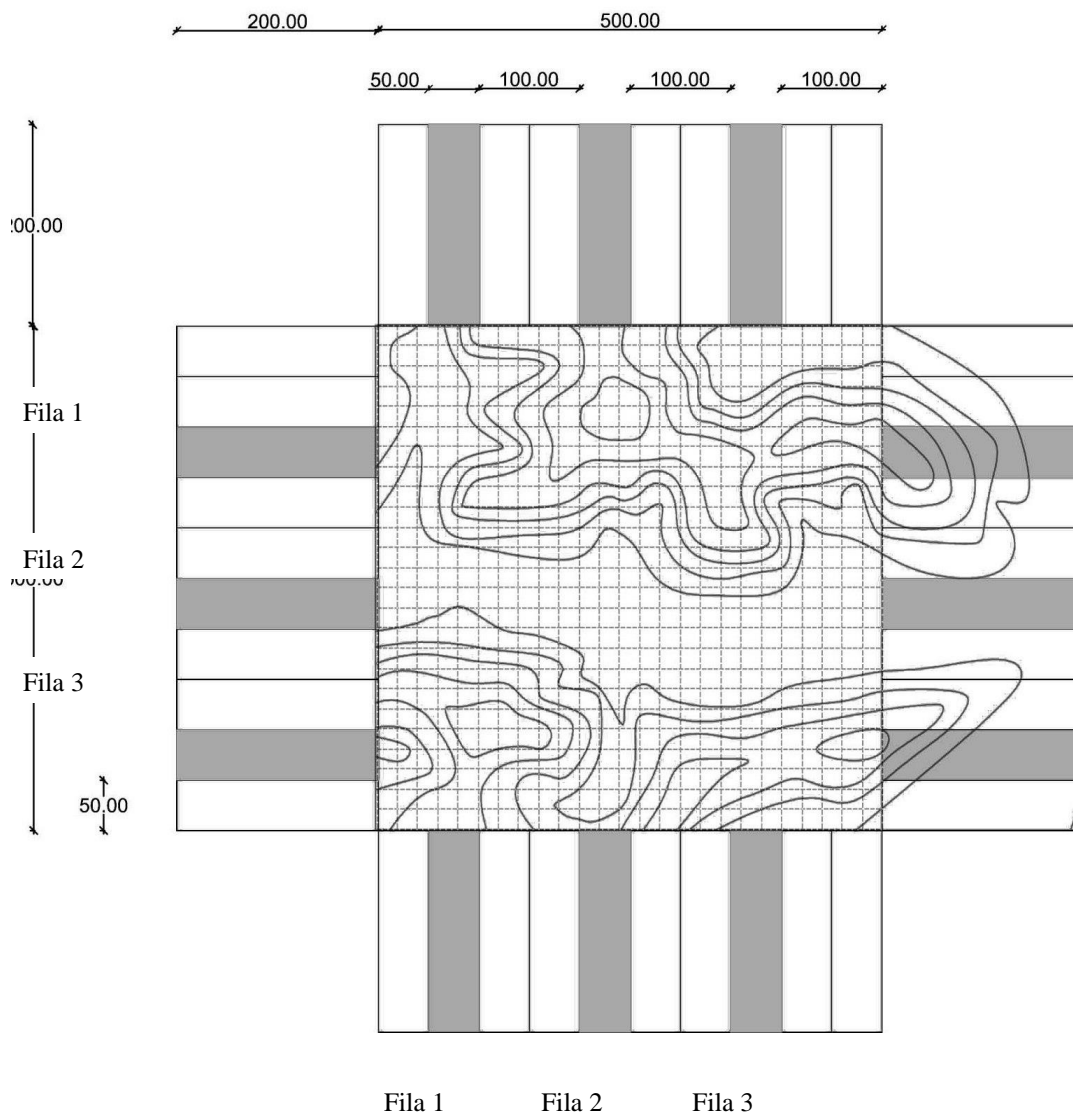


FIGURA 1. Diseño de muestreo en el área de estudio PDBY (25ha) localizada en el Parque nacional Yasuní. La zona cuadriculada del centro representa el lugar de colecta de plántulas y adultos, la parte sombreada en los extremos indica los transectos donde se colectó adultos, tres transectos por cada lado.



FIGURA 2. Raíces de los adultos de *Oenocarpus bataua*



FIGURA 3. Estadío de las plántulas colectadas de *Oenocarpus bataua* (presencia de 2 pinas).

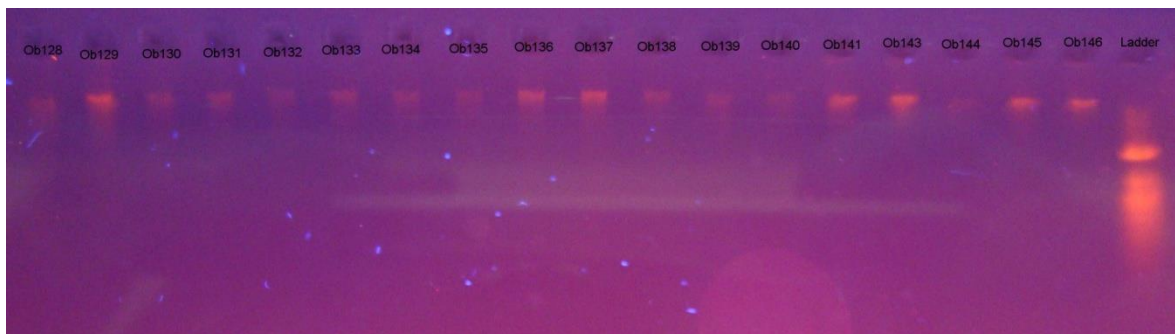


FIGURA 4. Verificación de la calidad y cantidad ADN visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb).

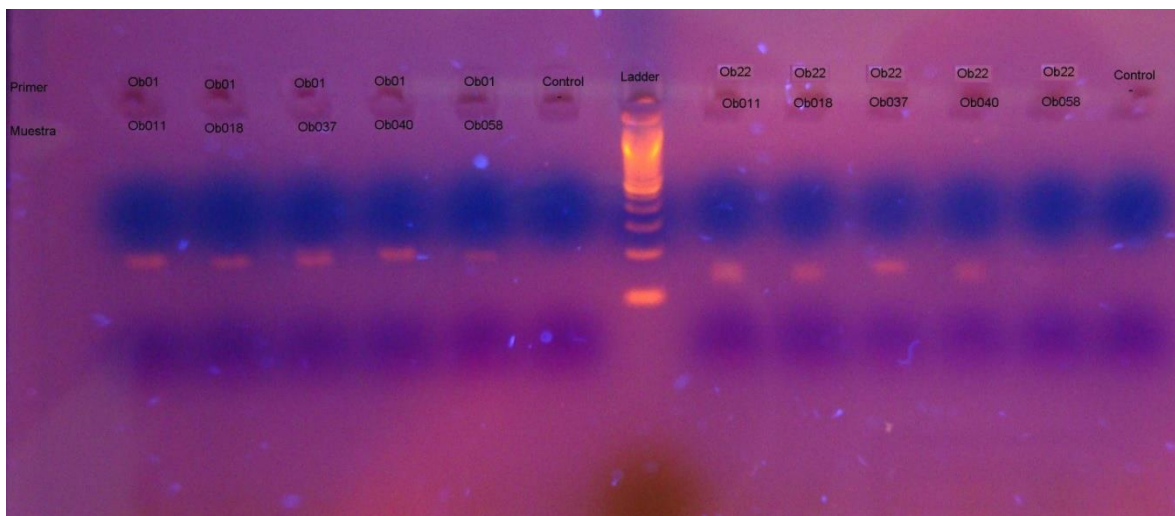


FIGURA 5. Amplificación de primers de *Oenocarpus bataua* (Ob01, Ob22) con muestras elegidas al azar, visualizado en un gel de agarosa al 1% con una escalera *Lowmass* (bandas cada 100 pb).

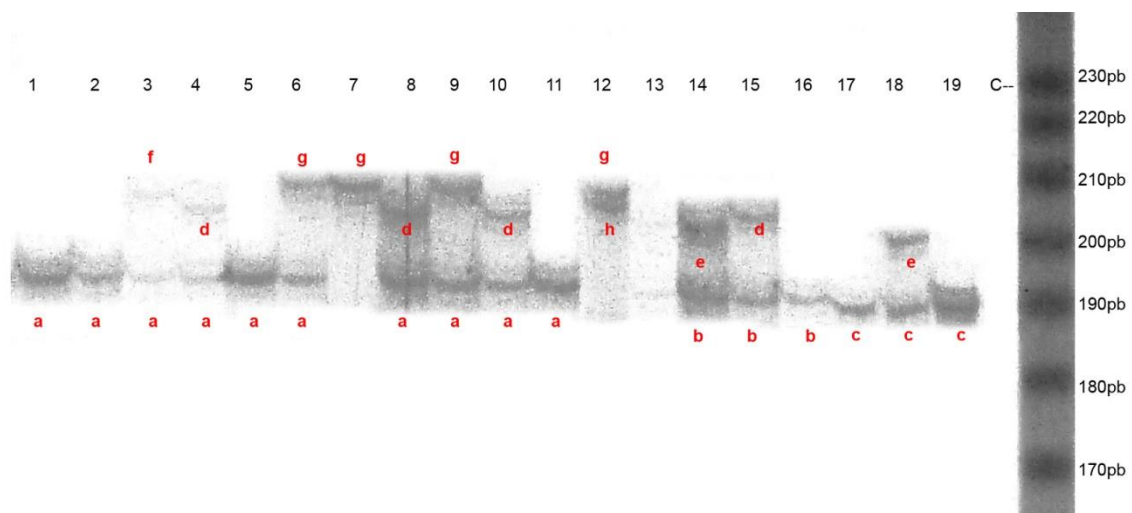


FIGURA 6. Amplificación con un primer polimórfico visualizado en un gel de poliacrilamida 6% y úrea 5M con una escalera 330bp (bandas cada 10 pb). Se observan ocho alelos obtenidos en 19 muestras elegidas al azar.

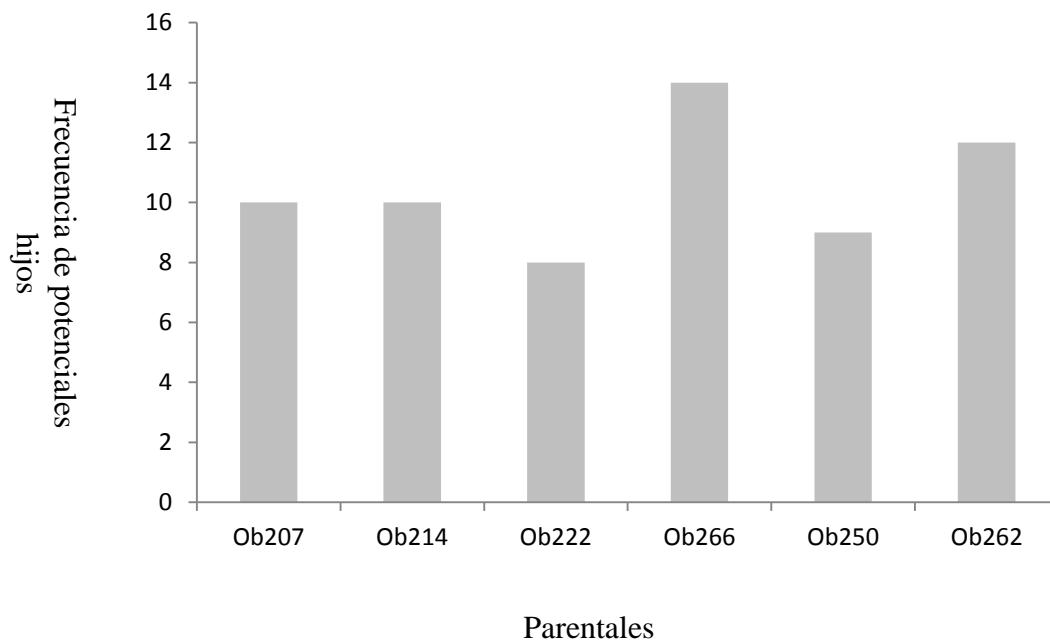


FIGURA 7 Individuos de *Oenocarpus bataua* descritos más frecuentemente como parentales de las plántulas estudiadas en la PDBY de 25 ha. Límites de la parcela (Ob207, Ob214, Ob222); Fuera del área de estudio (Ob266, Ob250, Ob262).

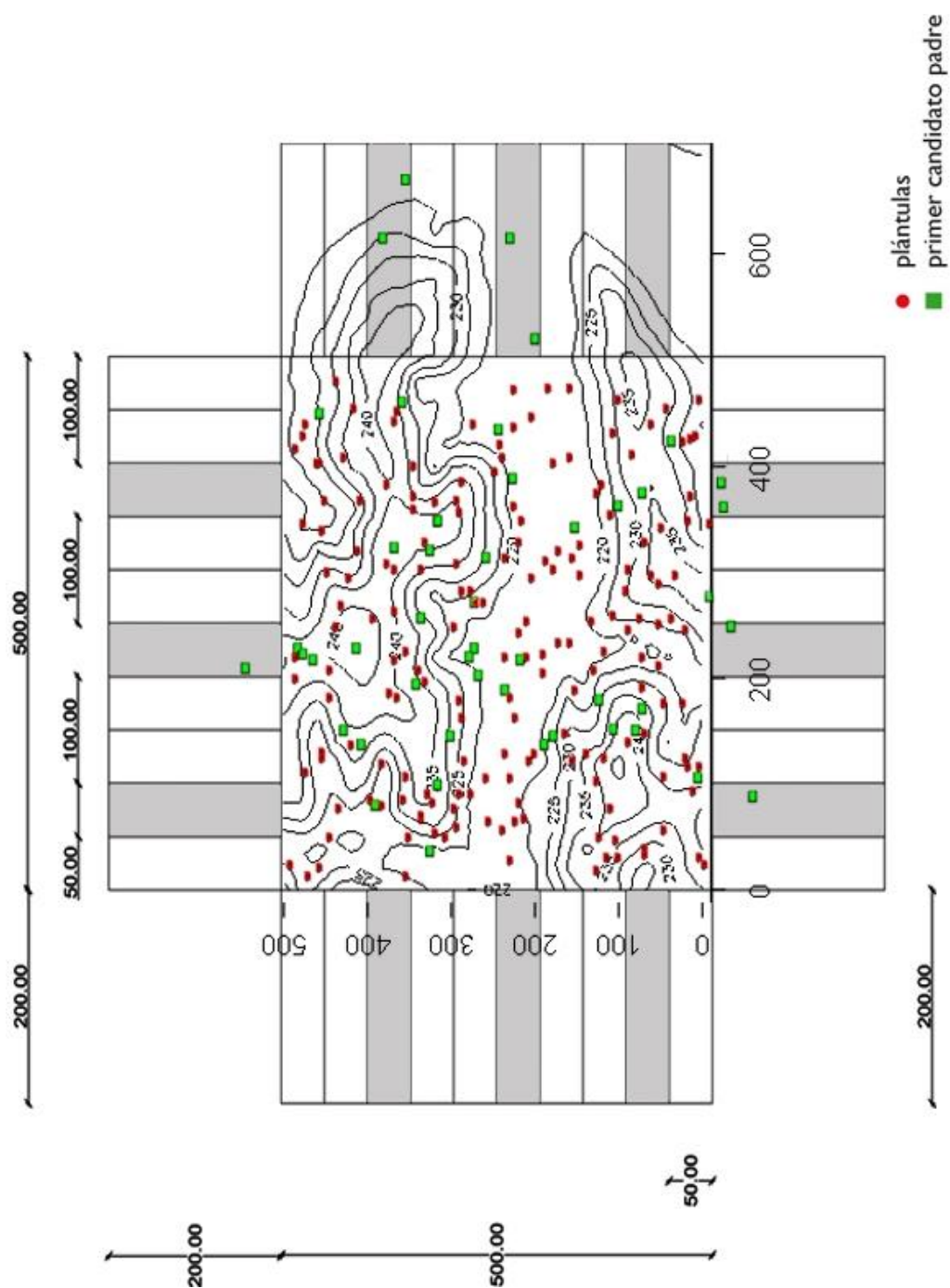


FIGURA 8. Distribución de Plántulas y primer candidato padre de *Oenocarpus bataua* estimado con el Programa Cervus 3.5 en 25 ha de la parcela PDBY.

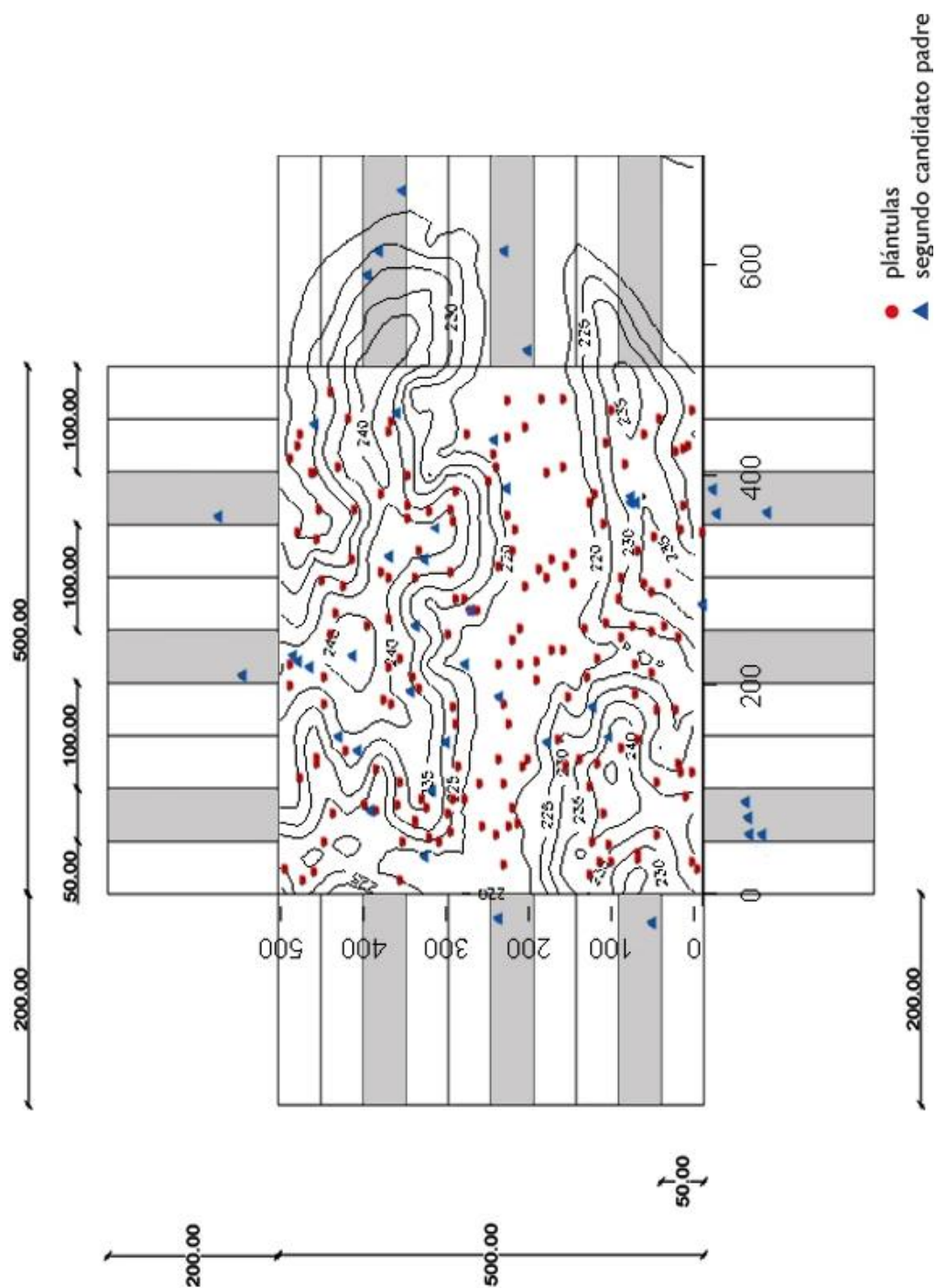


FIGURA 9. Distribución de Plántulas y segundo candidato padre de *Oenocarpus bataua* estimado con el Programa Cervus 3.5 en 25 ha de la parcela PDBY.

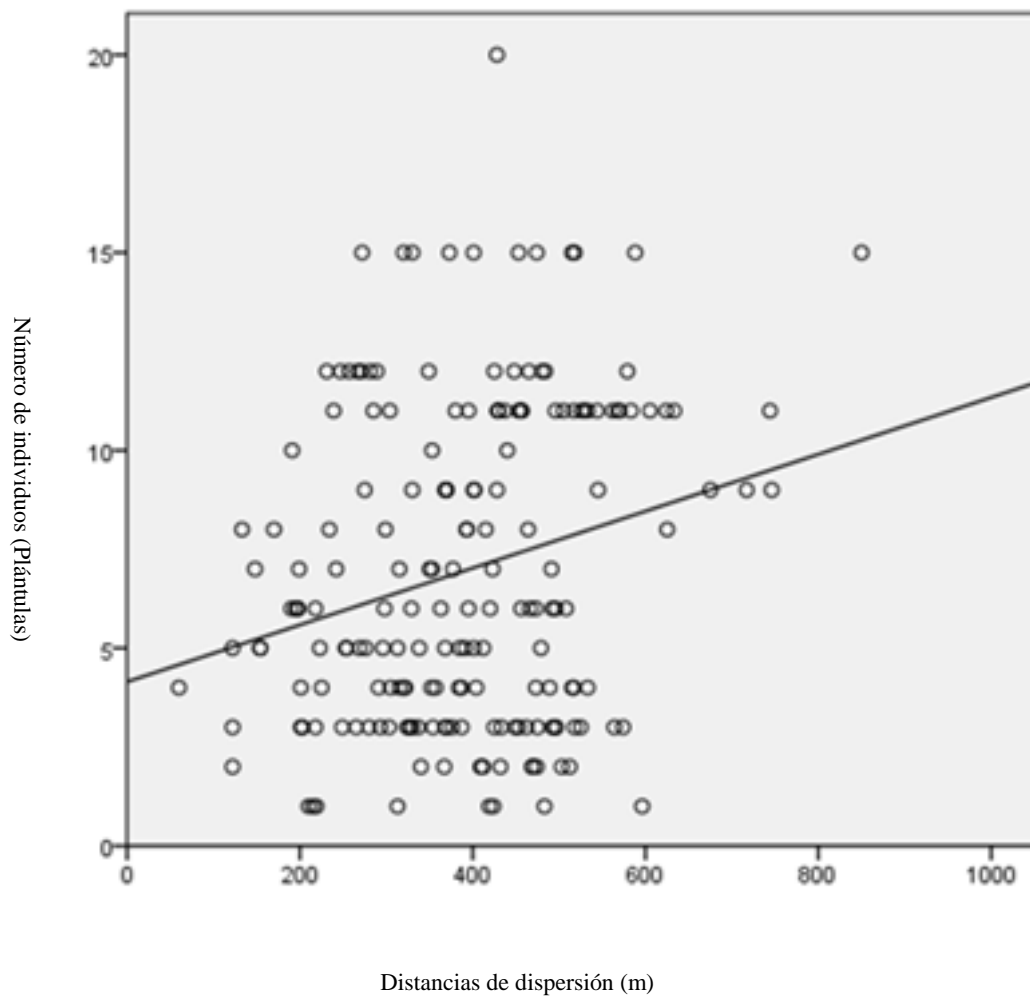


FIGURA 10. Correlación para potenciales padres, entre distancias de dispersión (metros) y número individuos (plántulas) de *Oenocarpus bataua*. ($r= 0.239$; $p= 0.001^{***}$)

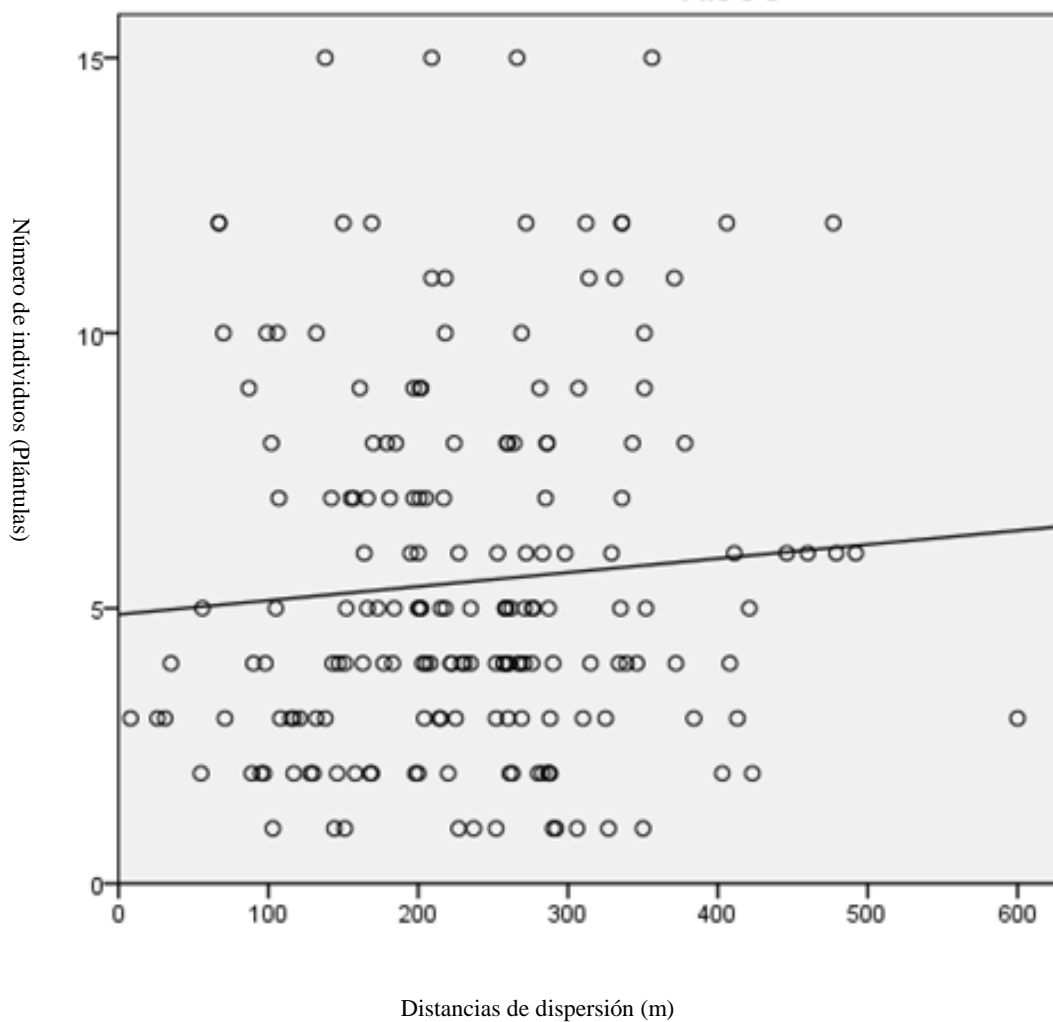


FIGURA 11. Correlación para potenciales madres, entre distancias de dispersión (metros) y número individuos (plántulas) de *Oenocarpus bataua*. ($r= 0.078$; $p= 0.292ns$)

11. TABLAS

TABLA 1. Información de 6 loci aislados para *Oenocarpus bataua* (Montúfar *et al.*, 2006)

Locus	Motivo repetitivo	Secuencia del primer (5'-3')	Tamaño (bp)
Ob01	(GA)17	F:TTTGAGTTCCCCAAATCTAATACA R: GGATGAGAGGCAAGGCATAA	180–220
Ob04	(GA)17	F: CCATATACGGGCAAATTAAG R: CATGTGAACACGCTAGGAG	145–190
Ob11	(GA)14	F: ATGAGGGATGTCAATGGAT R: AAAATTCTCCTCTCGCTCTT	145–185
Ob21	(GA)9- (GA)16	F: AGAGTGCTAGGGGTGCTCAT R: TGAAATGGTTGATGAATTGAATG	213–245
Ob22	(GA)5- (GATA)9 (GA)17	F: TTTGGATTGTCAAACCACTG R: ATCTCTTGCTTGCGGTCAAT	190–233
Ob23	(GA)20	F: GCCAAGTTGGAAGAAAGAAT R: CTCCTCTGATCTCTGTTTGG	150–178

TABLA 2. Protocolo utilizado para amplificar primers de *O. bataua*

Primers	Mix PCR	Protocolo amplificación
Ob01	Buffer: 1X	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
Ob04	MgCl ₂ : 2mM	*35 ciclos
Ob11	dNTPs: 370uM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
Ob21	Primers (F y R):0,15uM	Anillamiento: 30 segundos a 55°C
Ob22	Taq: 1U	Elongación: 45 segundos a 72°C
Ob23	ADN: 5ul	Elongación final: 10 minutos a 72°C

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

***valores altamente significativos no mostrados por Genepop.

Locus	Ob22	Ob21	Ob11	Ob04	Ob01	Ob23
Ob22	0	0,08	0,47	0,61	0,39	0,05
Ob21		0	0,28	0,87	***	0,24
Ob11			0	0,23	0,30	0,89
Ob04				0	0,32	0,026191 *
Ob01					0	0,001548
Ob23						**
						0

TABLA 4. Composición genética en plántulas de *Oenocarpus bataua*, analizada con 6 loci de microsatélites en n= 199.

Pop	Locus	N	Número de alelos (Na)	Diversidad alélica (A)	Het observada (Ho)	Het esperada (He)	F _{IS}	HWE	Alelos únicos
PP	Ob22	195	21	12,296	0,544	0,919	0,408***	***	
	Ob11	197	19	11,819	0,563	0,915	0,384***	***	
	Ob01	199	15	4,359	0,497	0,771	0,354***	***	
	Ob04	199	18	11,222	0,744	0,911	0,184**	***	
	Ob21	197	19	10,524	0,838	0,905	0,074	***	
	Ob23	199	13	5,984	0,603	0,833	0,276***	***	
Media de plántulas		198	18	9,367	0,631	0,876	0,280**		4.3

TABLA 5. Composición genética en adultos de *Oenocarpus bataua*, analizada con 6 loci de microsatélites en n= 60.

Adultos	Locus	N	Número de alelos (Na)	Diversidad alélica (A)	Het observada (Ho)	Het esperada (He)	F _{IS}	HWE
Adultos dentro de la parcela	Ob22	43	20	12,245	0,651	0,918	0,291***	***
	Ob11	44	15	8,922	0,773	0,888	0,130**	*
	Ob01	44	9	5,686	0,75	0,824	0,09	***
	Ob04	44	13	6,574	0,75	0,848	0,115**	ns
	Ob21	44	16	10,031	0,659	0,9	0,268***	***
	Ob23	44	9	5,297	0,682	0,811	0,160**	ns
Adultos fuera del área de estudio	Ob22	16	15	11,378	0,875	0,912	0,041	ns
	Ob11	16	12	8,678	0,75	0,885	0,152**	ns
	Ob01	16	3	2,829	0,438	0,646	0,323***	***
	Ob04	16	10	7,314	0,875	0,863	-0,014	*
	Ob21	16	12	6,4	0,75	0,844	0,111**	***
	Ob23	16	7	4,197	0,688	0,762	0,097	ns
Media adultos		30	12	7,462	0,72	0,842	0,147**	

TABLA 6. Matriz de valores *D de diferenciación* (Jost, 2008) obtenida en el programa SMOGD.

LOCI	PLÁNTULAS vs ADULTOS
Ob22	0,253
Ob11	0,050
Ob01	0,532
Ob04	0,206
Ob21	0,231
Ob23	0,093
PROMEDO	0,228**

Tabla 7. Resultados comparativos de estudios realizados en palmas en varias localidades del Ecuador y Bosques Amazónicos en Perú (diversidad alélica e índice de endogamia).

AUTOR	ESPECIE	ÁREA DE ESTUDIO	POBLACIÓN (Adultos)	NUMERO DE MUESTRAS	DIVERSIDAD ALÉLICA (He)	FIS	# SSRs
Espinoza (2010)	<i>Ceroxylon echinulatum</i>	1km X 1km	Nanegalito	30	0,475	0,135ns	7
			Mindo	30	0,408	0,06ns	
Escobar (2011)	<i>Prestoea acuminata</i>	500m X 500m	Nanegalito	27	0.64	0,222	6
			Chiriboga	38	0.68	0,371	
			Pahuma	20	0.67	0,109	
			Mindo	30	0.63	0,14	
			Cotopaxi	12	0.61	0,211	
			El Chaco	18	0.54	0,152	
			Cosanga	18	0.62	0,059	
Borja	22	0.52	0,10				
Baeza	43	0.53	0,134				
Karubian et al (no publicado)	<i>Oenocarpus bataua</i>	130ha	Chocó ecuatoriano	185	0.66	-0.019	12
Montufar (2007)	<i>Oenocarpus bataua</i>	5-15 km2	Pantoja	30	0.66	0,019	7
	<i>Amazonía Peruana (Región de Loreto)</i>		Intuto	30	0.73	-0,001	
			Jenaro Herrera	30	0.77	0,098	
Presente estudio	<i>Oenocarpus bataua</i>	25ha (1km X 500m)	Yasuní	60	0.84	0.147**	6

12. ANEXOS

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

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

11. Se centrifugó los tubos a máxima velocidad durante dos minutos para desechar cualquier residuo de buffer.

12. Se colocó la columna sobre un tubo con tapa nuevo de 1,5ml, y se añadió 100ul de *Elution Buffer* (E1). Se dejó incubar a temperatura ambiente durante un minuto y se centrifugó a máxima velocidad durante un minuto. La solución obtenida contiene gran cantidad de ADN por lo que representó la solución A, que será la solución madre.

13. Se repitió el paso 12 con la finalidad de obtener más ADN, dicha solución represento la solución B.

ANEXO 2. Protocolo de extracción de ADN manual (Doyle & 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 del 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 del Elution buffer y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Se almacenó la solución.

ANEXO 3. Preparación de geles de agarosa

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

ANEXO 4. Preparación y tinción de los geles de poliacrilamida basado en el protocolo del kit secuenciamiento de Promega.

Preparación y armado de los vidrios atrayente y repelente.

1. Se realizó un minucioso lavado de los vidrios con jabón y se enjuagó con abundante agua para que queden completamente limpios.

2. Una vez secos los vidrios, se los limpió a cada uno con etanol al 100%, sobre la cara tratada en ocasiones anteriores, mediante movimientos horizontales y verticales con ayuda de papel absorbente.

3. Al vidrio repelente se lo trató con 1,5ml de RainX (producto utilizado para tratar parabrisas de autos) mediante movimientos horizontales y verticales con toallas de papel.

4. Al vidrio atrayente se lo trató con una solución compuesta de 1ml de etanol al 100%, 5ul de ácido acético y 3ul de *Bind Silane* de Promega. Nuevamente mediante movimientos horizontales y verticales con toallas de papel. Se dejó secar por diez minutos y se retiró el exceso mediante movimientos en un solo sentido con toallas de papel.

5. Sobre la cara del vidrio atrayente se colocó los separadores, a la izquierda y derecha, que evitarán que la poliacrilamida se derrame por los lados. Se colocó los vidrios de tal manera que la cara tratada del repelente esté sobre la cara tratada del vidrio atrayente. Se selló la parte inferior de los vidrios con cinta adhesiva y se colocó varias pinzas sobre los bordes para que los vidrios permanezcan unidos.

Preparación de la poliacrilamida al 6% con úrea 5M.

1. Se pesó 24gr de úrea 5M, se colocó en un vaso de precipitación sobre el plato con agitación y se añadió 8ml de buffer TBE 10X.

2. Se agregó 16ml de poliacrilamida (acrilamida: bisacrilamida en proporción 19:1) y se colocó la solución en una probeta.

4. Se aforó con agua MilliQ a 80ml y se colocó la solución nuevamente en agitación.

5. Se colocó 500ul de Persulfato de Amonio al 10% y 50ul de TEMED, que actúan como catalizadores en la polimerización del gel.

6. Se colocó la solución en el espacio entre el vidrio repelente y atrayente precautelando que no se formen burbujas. Finalmente se colocó el peine con los dientes hacia afuera y se lo sujetó con pinzas para evitar que entre aire y se forme el frente de migración correctamente.

Precorrida y corrida del gel.

1. Una vez que el gel polimerizó, se retiró el peine, se limpió el frente de migración con agua para retirar el exceso de úrea y poliacrilamida, y se volvió a colocar el peine con los dientes hacia adentro de modo que se formen los pocillos en el gel. Se retiró las pinzas y la cinta.

2. Se colocó los vidrios con el gel en la cámara y se los sujetó con pinzas. Se llenó el compartimiento superior e inferior de la cámara con TBE 1X

3. Se recorrió el gel a 1500V, 65mA y 75W hasta que alcance una temperatura aproximada de 50°C.

4. Una vez denaturadas las muestras se las cargó en los pocillos del gel cuando éste alcanzó la temperatura deseada.

5. Se corrió el gel durante el tiempo necesario para tener una buena visualización de las bandas.

Fijación y tinción del gel.

1. Una vez terminada la corrida, se desarmó la cámara y se separó los vidrios. El gel debe quedar completamente adherido al vidrio atrayente.

2. Se colocó el vidrio atrayente sobre una bandeja con un litro de la solución de fijación previamente preparada y almacenada en frío (100ml de etanol al 100%, 5ml de ácido acético y se aforó a 1000ml con agua MilliQ), con la cara donde está el gel hacia arriba.

3. Se retiró la solución de fijación después de una hora, o cuando los componentes de la formamida hayan desaparecido (una línea celeste por Xilen Cianol, o una azul por azul de bromofenol, ambos componentes de la formamida), y se la almacenó para usarla después. Se mantuvo el vidrio en esta solución durante 10 minutos con agitación constante.

4. Una vez finalizados los diez minutos, se retiró el vidrio y se recuperó la solución fijadora, se colocó en la bandeja la solución de Nitrato de plata (6 ml de Nitrato de plata en 1000 ml de agua MilliQ y 2 ml de formaldehído), y se sumergió el vidrio durante 10 minutos con agitación constante.

6. Se desechó la solución de tinción (Nitrato de plata), y se lavó el gel con 100ml de agua MilliQ con el objetivo de retirar el exceso de plata.

7. Posteriormente se colocó sobre la bandeja la solución de revelado (Hidróxido de sodio en 1000 ml de agua MilliQ y 2 ml de formaldehído), se agitó hasta visualizar las bandas de la escalera o de los alelos.

8. Cuando todas las bandas fueron visibles, se retiró el vidrio de la solución de revelado y se lo colocó en la solución fijadora utilizada en el paso 2 durante 2 minutos, esto con el fin de parar la reacción y evitar que el gel se despegue del vidrio

10. Finalmente se retiró el gel de la solución fijadora y se lavó con agua MilliQ por 2 minutos, se retiró del agua y se colocó el vidrio en forma vertical para que se seque completamente.

ANEXO 5. Resultados del análisis de paternidad obtenidos con el programa Cervus 3.5.

ID	Loci	First	Loci	Pair	LOD	Second	Pair	LOD
OFFSPRINGS	typed	candidate	typed	score		candidate	score	
		ID				ID		
Ob001	6	Ob_223	6	-1,41E+00		Ob265	-2,10E+00	
Ob002	6	Ob_212	6	-8,44E+00		Ob_223	-8,56E+00	
Ob003	6	Ob_209	6	-4,26E+00		Ob_233	-8,08E+00	
Ob004	6	Ob_209	6	-9,53E+00		Ob_249	-7,85E+00	
Ob005	6	Ob_230	6	-8,99E+00		Ob_231	-3,63E+00	
Ob006	6	Ob_233	6	-9,20E+00		Ob_243	-3,88E+00	
Ob007	6	Ob_222	6	-7,58E+00		Ob252	-7,71E+00	
Ob008	6	Ob_216	6	-2,40E+00		Ob_250	-8,70E+00	
Ob009	6	Ob_233	6	-1,01E+01		Ob262	-4,21E+00	
Ob010	6	Ob_209	6	-9,53E+00		Ob_231	-1,22E+01	
Ob011	6	Ob_241	6	-7,25E+00		Ob255	-1,23E+01	
Ob012	6	Ob_214	6	-3,37E+00		Ob262	-8,15E+00	
Ob013	6	Ob_214	6	-8,91E+00		Ob_220	-4,28E+00	
Ob014	6	Ob_217	6	-1,25E+01		Ob_248	-1,18E+01	
Ob015	6	Ob_209	6	1,06E+00		Ob_216	-2,89E+00	
Ob016	6	Ob_228	6	-1,20E+01		Ob_239	-8,06E+00	
Ob017	6	Ob_228	6	-1,30E+01		Ob_250	-8,08E+00	
Ob018	6	Ob_209	6	-8,45E+00		Ob_220	-8,45E+00	
Ob019	6	Ob_236	6	-1,22E+01		Ob257	-7,17E+00	

Ob020	6	Ob_221	6	-9,65E+00	Ob_231	-8,33E+00
Ob021	6	Ob_227	6	-3,80E+00	Ob252	-8,37E+00
Ob022	6	Ob_217	6	-6,67E+00	Ob255	-1,32E+01
Ob023	6	Ob_224	6	-7,35E+00	Ob266	-9,09E+00
Ob024	6	Ob_247	6	-4,40E+00	Ob257	-1,28E+01
Ob025	6	Ob_222	6	-2,70E+00	Ob252	-4,67E+00
Ob026	6	Ob_223	6	-2,39E+00	Ob_229	-1,26E+01
Ob027	6	Ob_227	6	-1,28E+01	Ob259	-7,51E+00
Ob028	6	Ob_239	6	-8,10E+00	Ob253	-1,18E+01
Ob029	6	Ob_226	6	-6,36E+00	Ob_238	-7,05E+00
Ob030	6	Ob253	6	-3,58E+00	Ob255	-1,20E+01
Ob031	6	Ob_221	6	-9,03E+00	Ob_245	-8,27E+00
Ob032	0					
Ob033	6	Ob_222	6	-7,65E+00	Ob_239	-3,52E+00
Ob034	6	Ob_215	6	-1,29E+01	Ob_224	-7,97E+00
Ob035	6	Ob_229	6	-8,75E+00	Ob_245	-3,34E+00
Ob036	6	Ob_222	6	-1,33E+01	Ob_229	-2,02E+00
Ob037	6	Ob_209	6	-4,26E+00	Ob_224	-1,79E+00
Ob038	6	Ob_237	6	-1,24E+01	Ob253	-7,03E+00
Ob039	6	Ob_221	6	-1,35E+01	Ob_222	-7,92E+00
Ob040	6	Ob_247	6	-8,18E+00	Ob253	-7,52E+00
Ob041	6	Ob_224	6	-5,68E+00	Ob_227	-1,35E+01
Ob042	6	Ob253	6	-1,24E+01	Ob258	-8,64E+00

Ob043	6	Ob257	6	-7,17E+00	Ob258	-7,49E+00
Ob044	6	Ob_237	6	-1,36E+01	Ob259	-7,07E+00
Ob045	6	Ob_214	6	-7,83E+00	Ob_217	-1,41E+00
Ob046	6	Ob_216	6	-8,28E+00	Ob_217	-8,90E+00
Ob047	6	Ob_214	6	-8,92E+00	Ob_218	-1,28E+01
Ob048	6	Ob_227	6	-1,35E+01	Ob_229	-1,20E+01
Ob049	6	Ob_222	6	-3,73E+00	Ob262	-7,63E+00
Ob050	0					
Ob051	6	Ob_231	6	-1,40E+01	Ob_250	-3,39E+00
Ob052	6	Ob_215	6	-1,27E+01	Ob_218	-1,27E+01
Ob053	6	Ob_215	6	-8,06E+00	Ob_218	-1,20E+01
Ob054	6	Ob_247	6	-1,05E+01	Ob253	-4,94E+00
Ob055	6	Ob_217	6	-8,63E+00	Ob_222	-7,96E+00
Ob056	6	Ob_218	6	-7,22E+00	Ob253	-3,25E+00
Ob057	6	Ob_229	6	-7,23E+00	Ob253	-4,28E+00
Ob058	6	Ob_231	6	1,35E+00	Ob_241	-3,68E+00
Ob059	6	Ob_213	6	-6,41E+00	Ob_229	-2,18E+00
Ob060	6	Ob_220	6	-1,25E+01	Ob_235	-6,44E+00
Ob061	6	Ob_222	6	3,33E+00	Ob253	1,25E+00
Ob062	6	Ob_214	6	-8,22E+00	Ob262	1,98E+00
Ob063	6	Ob_214	6	-8,91E+00	Ob263	-8,64E+00
Ob064	6	Ob_239	6	-9,38E+00	Ob262	-9,01E+00
Ob065	6	Ob_222	6	-1,47E+00	Ob_223	-3,13E+00

Ob066	6	Ob_248	6	1,91E+00	Ob255	-9,30E+00
Ob067	6	Ob_221	6	-1,17E+01	Ob_222	-6,08E+00
Ob068	6	Ob256	6	-8,78E+00	Ob262	-2,72E+00
Ob069	6	Ob_249	6	-3,31E+00	Ob_250	-3,39E+00
Ob070	6	Ob_209	6	-9,22E+00	Ob254	-7,85E-01
Ob071	6	Ob_212	6	-1,13E+00	Ob_241	-3,42E+00
Ob072	6	Ob_245	6	1,69E+00	Ob257	-6,51E+00
Ob073	6	Ob_220	6	-1,07E+01	Ob_245	-3,63E+00
Ob074	6	Ob_230	6	-7,16E+00	Ob253	-2,85E+00
Ob075	6	Ob261	6	-5,92E+00	Ob266	-2,10E+00
Ob076	0					
Ob077	6	Ob_214	6	-8,21E+00	Ob264	-7,02E+00
Ob078	6	Ob_236	6	-1,16E+01	Ob_248	-7,96E+00
Ob079	6	Ob_207	6	-8,04E+00	Ob_214	-1,28E+01
Ob080	6	Ob_220	6	-1,07E+01	Ob266	-5,78E+00
Ob081	6	Ob_239	6	-4,83E+00	Ob252	-1,33E+01
Ob082	6	Ob_219	6	-1,40E+01	Ob_243	-1,38E+01
Ob083	6	Ob_239	6	-5,44E+00	Ob_249	-7,11E+00
Ob084	6	Ob_219	6	-1,40E+01	Ob_239	-4,83E+00
Ob085	6	Ob_218	6	-2,18E+00	Ob_224	-8,56E+00
Ob086	6	Ob_223	6	-8,18E+00	Ob253	-3,24E+00
Ob087	0					
Ob089	6	Ob_211	6	-4,55E+00	Ob_248	-4,71E+00

Ob090	6	Ob_211	6	-1,22E+01	Ob_218	-2,47E+00
Ob090	6	Ob_216	6	-1,22E+01	Ob_218	-2,47E+00
Ob091	6	Ob_231	6	-2,54E+00	Ob266	-2,59E+00
Ob092	6	Ob_213	6	-1,23E+01	Ob_248	5,96E-01
Ob093	6	Ob_226	6	-6,57E+00	Ob_227	-8,50E+00
Ob094	6	Ob258	6	-8,40E+00	Ob262	-3,09E+00
Ob095	6	Ob_218	6	-2,41E+00	Ob_236	-2,96E+00
Ob096	6	Ob_215	6	-8,26E+00	Ob_242	-7,80E+00
Ob097	6	Ob253	6	-4,27E+00	Ob261	-1,17E+01
Ob098	6	Ob_235	6	-4,92E-01	Ob253	-2,11E+00
Ob099	6	Ob_230	6	-3,84E-01	Ob258	-5,13E+00
Ob100	6	Ob_248	6	-2,03E+00	Ob266	-7,61E+00
Ob101	6	Ob_213	6	-1,26E+01	Ob260	-7,97E+00
Ob102	6	Ob_217	6	-5,43E+00	Ob258	-6,07E+00
Ob103	6	Ob255	6	-7,10E+00	Ob266	-9,56E+00
Ob104	6	Ob_214	6	-9,60E+00	Ob_242	-7,73E+00
Ob105	6	Ob_249	6	1,34E+00	Ob254	-7,73E+00
Ob106	6	Ob_244	6	-8,29E+00	Ob253	-3,70E+00
Ob107	6	Ob_214	6	-7,83E+00	Ob_248	-8,82E+00
Ob108	6	Ob_244	6	-7,69E+00	Ob253	-8,54E+00
Ob109	6	Ob_220	6	-8,80E+00	Ob259	-8,43E+00
Ob110	6	Ob_248	6	-2,58E+00	Ob266	1,11E+00
Ob111	6	Ob_207	6	-3,49E+00	Ob_250	-7,79E+00

Ob112	6	Ob_228	6	-1,16E+01	Ob_238	-8,44E+00
Ob113	6	Ob_237	6	-1,35E+01	Ob_250	-1,34E+01
Ob114	6	Ob251	6	-1,07E+01	Ob266	-6,90E+00
Ob115	6	Ob_207	6	-8,26E+00	Ob256	-2,32E+00
Ob116	6	Ob_222	6	-7,30E+00	Ob_245	-6,29E+00
Ob117	6	Ob251	6	-5,36E+00	Ob255	-1,23E+01
Ob118	6	Ob_227	6	-1,15E+01	Ob266	-1,26E+01
Ob119	6	Ob_220	6	-7,51E+00	Ob_221	-1,21E+01
Ob120	6	Ob261	6	-6,12E+00	Ob264	-5,11E+00
Ob121	6	Ob_211	6	-8,33E+00	Ob_229	-8,50E+00
Ob122	6	Ob_237	6	-8,39E+00	Ob256	-8,00E+00
Ob123	6	Ob_222	6	-2,66E+00	Ob_239	-2,16E+00
Ob124	6	Ob_207	6	-7,32E+00	Ob258	-1,69E+01
Ob125	6	Ob_207	6	-1,37E+01	Ob_250	-7,27E+00
Ob126	6	Ob_208	6	-8,35E+00	Ob_231	-1,26E+01
Ob127	6	Ob_207	6	-1,30E+01	Ob_250	-1,19E+01
Ob128	6	Ob253	6	-1,21E+01	Ob259	-1,22E+01
Ob129	6	Ob_219	6	-9,77E-01	Ob_220	-8,37E+00
Ob130	6	Ob_219	6	-1,10E+01	Ob_247	-7,99E+00
Ob131	0					
Ob132	6	Ob_234	6	-5,33E+00	Ob_242	-6,35E+00
Ob133	6	Ob_225	6	-1,07E+01	Ob_231	-5,72E+00
Ob134	6	Ob_221	6	-1,42E+01	Ob_247	-7,30E+00

Ob135	6	Ob_245	6	-7,97E+00	Ob_249	-7,95E+00
Ob136	6	Ob261	6	-6,55E+00	Ob264	-1,12E-02
Ob137	6	Ob_247	6	-1,29E+01	Ob266	-1,22E+01
Ob138	6	Ob_250	6	-8,22E+00	Ob266	-8,28E+00
Ob139	6	Ob_241	6	-3,78E+00	Ob_250	-8,22E+00
Ob140	6	Ob_240	6	-1,11E+01	Ob_248	-1,23E+01
Ob141	6	Ob_234	6	-8,51E+00	Ob_250	-9,39E+00
Ob143	6	Ob_250	6	-8,71E+00	Ob258	-3,45E+00
Ob144	6	Ob_213	6	-7,68E+00	Ob_248	-6,06E+00
Ob145	6	Ob_211	6	-9,98E+00	Ob_250	-7,34E+00
Ob146	6	Ob_207	6	-1,31E+01	Ob256	-8,63E+00
Ob147	6	Ob_228	6	-2,83E+00	Ob266	1,07E+00
Ob148	6	Ob_215	6	-8,73E+00	Ob_221	-3,80E+00
Ob149	6	Ob_213	6	-7,68E+00	Ob_241	-3,61E+00
Ob150	0					
Ob151	6	Ob_228	6	-7,37E+00	Ob_241	-3,46E+00
Ob152	6	Ob_220	6	-7,45E+00	Ob_227	-2,37E+00
Ob153	6	Ob_228	6	-7,53E+00	Ob_231	-9,47E+00
Ob154	6	Ob_218	6	-6,54E+00	Ob_239	-2,68E+00
Ob155	6	Ob260	6	-7,90E+00	Ob262	-8,98E+00
Ob156	6	Ob_212	6	-5,80E+00	Ob_241	-8,13E+00
Ob157	6	Ob_211	6	-8,25E+00	Ob255	-7,78E+00
Ob158	6	Ob_216	6	-1,26E+01	Ob_224	-1,25E+01

Ob160	6	Ob_228	6	-6,38E+00	Ob262	2,79E+00
Ob161	6	Ob_214	6	-3,61E+00	Ob260	-8,52E+00
Ob162	6	Ob_207	6	-7,21E+00	Ob256	-6,78E+00
Ob163	6	Ob_213	6	-6,37E+00	Ob255	-1,23E+01
Ob164	6	Ob_224	6	-7,98E+00	Ob_243	-8,11E+00
Ob165	6	Ob_218	6	-8,04E+00	Ob256	-3,18E+00
Ob166	6	Ob_230	6	-8,63E+00	Ob_231	-8,32E+00
Ob168	6	Ob_228	6	-7,53E+00	Ob262	-6,83E+00
Ob169	6	Ob255	6	-1,25E+00	Ob257	-1,21E+01
Ob170	6	Ob_208	6	-8,06E+00	Ob_219	-3,67E+00
Ob171	6	Ob_207	6	-7,68E+00	Ob_230	-7,89E+00
Ob172	6	Ob_207	6	-1,74E+00	Ob255	-1,36E+00
Ob173	0					
Ob174	6	Ob_219	6	-9,33E+00	Ob262	-6,40E+00
Ob175	6	Ob_220	6	-3,19E+00	Ob_222	-2,46E+00
Ob176	6	Ob_213	6	-1,18E+01	Ob_220	-6,87E+00
Ob177	6	Ob_216	6	-1,29E+01	Ob266	-7,75E+00
Ob178	6	Ob_220	6	-8,89E+00	Ob_248	-1,28E+01
Ob179	6	Ob_213	6	-1,33E-01	Ob_215	-1,24E+00
Ob180	6	Ob_215	6	-2,53E+00	Ob266	-6,48E+00
Ob181	6	Ob_210	6	-1,22E+01	Ob251	-1,12E+01
Ob182	6	Ob_210	6	-1,14E+01	Ob_217	-1,08E+01
Ob183	6	Ob_212	6	-6,26E+00	Ob_218	-7,94E+00

Ob185	6	Ob_208	6	-1,32E+01	Ob_209	-1,26E+01
Ob186	6	Ob_238	6	-7,24E-01	Ob255	-1,31E+01
Ob187	6	Ob_248	6	-3,13E+00	Ob266	-7,97E+00
Ob188	6	Ob_220	6	-8,43E+00	Ob_237	-7,80E-01
Ob189	6	Ob256	6	-1,99E+00	Ob261	-6,32E+00
Ob190	6	Ob_221	6	-2,18E-01	Ob_238	-1,04E+00
Ob191	6	Ob_248	6	-8,67E+00	Ob260	-1,30E+01
Ob193	6	Ob_213	6	-1,10E+01	Ob_220	-1,18E+01
Ob194	6	Ob_210	6	-1,21E+01	Ob_218	-1,23E+01
Ob195	6	Ob_214	6	1,38E-01	Ob_215	-1,03E+01
Ob196	6	Ob_207	6	-2,80E+00	Ob260	-7,84E+00
Ob198	6	Ob_222	6	-8,32E+00	Ob261	-6,82E+00
Ob199	6	Ob_238	6	-2,25E+00	Ob256	-7,78E+00
Ob200	6	Ob_212	6	-6,19E+00	Ob261	-6,54E+00
Ob201	6	Ob_210	6	-1,26E+00	Ob_211	-8,63E-01
Ob202	6	Ob_207	6	-6,34E+00	Ob_220	-1,59E+00
Ob203	6	Ob_214	6	3,35E+00	Ob_220	-3,84E+00
Ob204	6	Ob256	6	-7,48E+00	Ob266	-2,83E+00
Ob205	6	Ob_220	6	-4,08E-01	Ob_221	3,91E+00
Ob206	0					
