

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

**Estudio de la estructura genética de seis poblaciones de *Drosophila mesophragmatica* de
la Provincia de Pichincha, Ecuador**

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

GABRIELA POZO ANDRADE

QUITO, 2011

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Gabriela Pozo Andrade ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dra. Violeta Rafael

Directora de la Disertación

Quito, 10 de febrero de 2011

AGRADECIMIENTOS

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por proveer los fondos necesarios para la realización de esta investigación, éstos vinieron de: Plan de gastos del fondo obtenido a través de la donación voluntaria del Impuesto a la Renta Escuela de Ciencias Biológicas, 2008 (Ejercicio fiscal 2006).

A los codirectores de este trabajo, Dra. Violeta Rafael y Dr. Rommel Montúfar, por su guía y amistad permanente, les agradezco de manera muy especial. Al Dr. Clifford Keil por sus consejos valiosos en la corrección de la disertación.

A mis padres y hermanas por su apoyo constante y por su paciencia.

A Sebastián Falah por ayudarme a tomar las cosas con más tranquilidad.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Evolutiva: Diego Céspedes, Luna Figuero y Renata León, por su compañía en las salidas de campo y gran ayuda.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular: Sebastián Espinoza, José Manuel Barreiro, Sebastián Escobar, Ana Troya, Diego Morales y Juan Pablo Almeida por toda su ayuda. Un agradecimiento especial a Juan Carlos Escobar y Jalil Manguashca por su importante colaboración en el éxito de esta investigación.

A mis amigos biólogos por acompañarme en esta larga carrera.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	RESUMEN.....	1
2.	ABSTRACT.....	3
3.	INTRODUCCIÓN.....	5
3.1	EL GÉNERO <i>DROSOPHILA</i>	5
3.2	EL GRUPO <i>MESOPHRAGMATICA</i> COMO OBJETO DE ESTUDIO.....	6
3.3	BIOLOGÍA MOLECULAR, HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES	8
3.3.1	GENÉTICA DE POBLACIONES.....	8
3.3.2	BIOLOGÍA MOLECULAR COMO HERRAMIENTA.....	9
3.5	MICROSATÉLITES	12
3.6	ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL	14
3.6.1	ANÁLISIS DE POBLACIONES ÚNICAS.....	14
3.6.2	ANÁLISIS DE MÚLTIPLES POBLACIONES.....	17
3.7	INVESTIGACIONES RELACIONADAS E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	21
3.7.1	ESTUDIOS DE <i>D. MESOPHRAGMATICA</i> Y DE ESTRUCTURA POBLACIONAL EN <i>DROSOPHILA</i>	21
3.7.2	TRANSFERIBILIDAD DE MICROSATÉLITES.....	23
3.7.3	IMPORTANCIA Y OBJETIVO DEL ESTUDIO	24
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS.....	26

4.1.1	SALIDAS DE CAMPO.....	26
4.1.2	FASE DE LABORATORIO.....	27
4.2	EXTRACCIÓN DE ADN.....	28
4.3	ESTANDARIZACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE PCR.....	29
4.4	VISUALIZACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS.....	30
4.5	ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	32
5.	RESULTADOS.....	35
5.1	OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y LOCALIDADES.....	35
5.2	AMPLIFICACIÓN.....	35
5.3	ANÁLISIS INTRAPOBLACIONALES.....	36
5.4	ANÁLISIS INTERPOBLACIONALES.....	38
6.	DISCUSIÓN.....	41
6.1	LOCALIDADES Y MUESTRAS OBTENIDAS.....	41
6.2	ÉXITO DE LA TRANSFERENCIA DE LOS MARCADORES.....	42
6.3	NÚMERO DE MARCADORES UTILIZADOS.....	45
6.4	ANÁLISIS INTRAPOBLACIONALES.....	45
6.4.1	DIVERSIDAD GÉNÉTICA EXISTENTE EN LAS POBLACIONES.....	45
6.4.2	EQUILIBRIO H-W.....	47
6.4.3	EQUILIBRIO LIGADO.....	49
6.5	ANÁLISIS INTERPOBLACIONALES.....	50
6.5.1	ENDOGAMIA.....	50
6.5.2	DIVERGENCIA GÉNÉTICA ENTRE POBLACIONES.....	50

6.5.3	BARRERAS GEOGRÁFICAS Y HUMANAS	51
6.5.4	FLUJO GÉNICO EXISTENTE ENTRE LAS DIFERENTES POBLACIONES.....	56
7.	CONCLUSIONES.....	60
8.	LITERATURA CITADA	62
9.	FIGURAS.....	72
10.	TABLAS.....	78
11.	ANEXOS	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Lugares de captura de <i>D. mesophragmatica</i> de la Provincia de Pichincha, Ecuador.....	73
Figura 2.	Valores de <i>h</i> según la combinación de marcador tomado en cuenta...	74
Figura 3.	Valores de <i>h</i> promedio según el número de marcadores utilizados.....	74
Figura 4.	Valores de Theta (H) según la combinación de marcador tomado en cuenta.....	75
Figura 5.	Valores de Theta (H) promedio según el número de marcadores utilizados.....	75
Figura 6.	Número de alelos por locus en cada población.....	76
Figura 7.	PCoA vía matriz de covariancia sin estandarización de datos usando como matriz los F_{ST} entre parejas de poblaciones.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	N° de individuos de <i>D. mesophragmatica</i> capturados en las diferentes localidades.....	79
Tabla 2.	Coordenadas y altura de las localidades muestreadas.....	79
Tabla 3.	Temperatura promedio y humedad relativa promedio de los sitios de recolección de <i>D. mesophragmatica</i>.....	80
Tabla 4.	<i>Primers</i> probados para el presente estudio.....	81
Tabla 5.	Condiciones de amplificación y de corrida (geles de poliacrilamida) de los <i>primers</i> utilizados en el presente estudio.....	82
Tabla 6.	Número de alelos por locus en las seis poblaciones de <i>D. mesophragmatica</i>.....	83
Tabla 7.	Alelos únicos en cinco poblaciones de <i>D. mesophragmatica</i>.....	83
Tabla 8.	Variabilidad genética en las diferentes poblaciones de <i>D. mesophragmatica</i>.....	84
Tabla 9.	Equilibrio de Hardy-Weinberg según cada locus estudiado.....	84
Tabla 10.	Desequilibrio ligado significativo según par de loci analizados.....	85
Tabla 11.	Estadístico F_{IS} calculado para cada población y F_{IT} calculado como un promedio de todas las poblaciones.....	85
Tabla 12.	Valores F_{ST} ordenados.....	86
Tabla 13.	Distancia geográfica entre cada par de poblaciones estudiadas (en kilómetros).....	87
Tabla 14.	Distancia geográfica entre cada par de poblaciones (transformadas a	

	ln km).....	87
Tabla 15.	AMOVA (locus por locus).....	88
Tabla 16.	Distancias geográficas según flujo génico en poblaciones del intervalle o de la cordillera hacia el intervale (en km).....	88

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.	Trampa para la captura de <i>D. mesophragmatica</i>.....	90
Anexo 2.	Características morfológicas de <i>D. mesophragmatica</i>.....	91
Anexo 3.	Estructuras útiles para la identificación de <i>D. mesophragmatica</i>.....	92
Anexo 4.	Protocolo de extracción de ADN.....	93
Anexo 5.	Protocolo gel de poliacrilamida.....	95
Anexo 6.	Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de <i>D. mesophragmatica</i>.....	97
Anexo 7.	Correlación entre temperatura y humedad relativa en las diferentes localidades.....	103
Anexo 8.	Geles de poliacrilamida.....	104
Anexo 9.	Frecuencias Alélicas.....	106
Anexo 10.	Índices de diversidad estándar para cada población.....	108
Anexo 11.	Pruebas exactas de equilibrio Hardy-Weinberg.....	110
Anexo 12.	Pruebas de desequilibrio ligado para cada par de loci con sus tablas de significancia.....	112
Anexo 13.	F_{ST} entre parejas de poblaciones.....	118
Anexo 14.	Valores de P y tabla de P significativos para los F_{ST}.....	119
Anexo 15.	Prueba de Mantel.....	120

1. RESUMEN

El grupo *mesophragmatica* comprende 13 especies de *Drosophila* neotropicales endémicas del continente Sudamericano, entre ellas la especie *Drosophila mesophragmatica*. El objetivo del presente estudio fue aportar al conocimiento de la dinámica poblacional de *D. mesophragmatica* mediante un estudio molecular. Se realizó la captura de individuos de la especie en seis poblaciones localizadas en la Provincia de Pichincha. Los individuos machos fueron identificados como *D. mesophragmatica* mediante observaciones de su morfología y de sus *genitalia*. Se extrajo el ADN y se procedió a ensayar la amplificación del mismo con *primers* de microsatélites de *D. mojavensis*. La transferibilidad de los marcadores de *D. mojavensis* a *D. mesophragmatica* fue muy baja. Sin embargo, los 5 marcadores obtenidos fueron suficientes para los análisis realizados. Se efectuaron los análisis intrapoblaciones de frecuencia alélica, heterocigosidad observada, heterocigosidad esperada, rango alélico, equilibrio Hardy-Weinberg y desequilibrio ligado, mientras que para los análisis interpopulacionales se utilizaron los estadísticos F, AMOVA y PCoA. Los análisis de diversidad genética mostraron poblaciones con alta variabilidad. Los diferentes loci están en equilibrio ligado, sin embargo no todos ellos se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg.. La diferenciación genética entre las poblaciones es baja, es decir las poblaciones son bastante parecidas. El flujo génico es importante entre todas las poblaciones. Sin embargo esta diferenciación genética baja es de todas maneras significativa e indica una cierta estructuración poblacional. Parecería que los Andes están actuando como barrera de un flujo génico elevado para las poblaciones que se encuentran tanto hacia la Costa (Lloa) como hacia el Oriente (Antisanillo). Por otro lado, la ciudad de Quito, sus alrededores y zonas agrícolas también podrían estar actuando como barreras de

un flujo génico elevado entre ciertas poblaciones. Es muy probable que las poblaciones en estudio se traten de una metapoblación.

Palabras clave: Grupo *mesophragmatica*, Andes, Estructura Poblacional, Flujo Génico, Microsatélites.

2. ABSTRACT

The *mesophragmatica* group contains 13 neotropical species endemic to the South American continent, including *D. mesophragmatica*. The objective of this study was to provide information about the population dynamics of *D. mesophragmatica* with the help of molecular markers. Individuals from 6 populations in the Pichincha Province were captured. The individuals were identified as *D. mesophragmatica* by morphological characteristics and observations of the male *genitalia*. DNA was extracted from each individual and amplification of certain sectors of the DNA was tested with microsatellite *primers* specific to *D. mojavensis*. The cross-species amplification rate was low, however five molecular markers provided data, sufficient for the analysis. The intrapopulation analysis executed were allelic frequencies, observed heterozygosity, expected heterozygosity, allelic range, Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium. The interpopulation analyses utilized F-stats, AMOVA and PCoA. The genetic diversity studies revealed populations with a significant variability. The loci are in linkage equilibrium but not all of them are in Hardy-Weinberg equilibrium. The genetic differentiation between populations was very low, which would indicate that the populations are similar and that gene flow has been significant. The low genetic differentiation indicated population structure. The Andes may act as a barrier to gene flow between populations located on Ecuador's Coast in the west and Amazonia in the east with populations located in the Interandean zone. The city of Quito, its surroundings and agricultural areas may also have acted as barriers to gene flow between certain populations located in the Interandean zone. It is very likely that the populations in study are in fact a metapopulation.

Key Words: *mesophragmatica* Group, Andes, Population Structure, Gene Flow, Microsatellites.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 EL GÉNERO *DROSOPHILA*

Drosophilidae es una familia del orden *Diptera*, son moscas acaliptradas de la superfamilia *Ephydriidae*. No se conoce con certeza cuál es el taxón hermano de esta familia pero se asume que es la familia *Camilidae*. La familia *Drosophilidae* se habría originado en los trópicos hace 50 millones de años en el Eoceno, posiblemente antes (Waggoner, en línea, 2009; Wiegmann & Yeates, en línea, 1996).

La familia *Drosophilidae* comprende más de 3,300 especies descritas y se divide en dos subfamilias: *Steganinae* y *Drosophilinae*. La subfamilia *Drosophilinae* contiene 38 géneros, uno de ellos es *Drosophila* (Powell, 1997). Dentro del género *Drosophila* existen aproximadamente 2000 especies descritas (Markow y O'Grady, 2008a). Las distribuciones de las diferentes especies son muy variadas, existen especies con una distribución restringida como es el caso de *D. mojavensis* que vive exclusivamente en los desiertos de Sonora y Mojave de Norteamérica (Ross y Markow, 2006), así como *D. mesophragmatica* que se encuentra únicamente en los Andes (Vela y Rafael, 2004). También hay especies de distribución cosmopolita, ellas son: *D. busckii*, *D. hydei*, *D. immigrans*, *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. ananassae*, *D. funebiris* y *D. repleta* (Markow y O'Grady, 2008a). Las drosófilas son moscas especializadas que se aparean en plantas en descomposición y material fúngico. La mayoría de ellas se nutren de plantas y frutos u hongos descompuestos gracias a la acción de bacterias y levaduras (Powell, 1997).

Actualmente el género *Drosophila* consta de 8 subgéneros, de los cuales los subgéneros *Drosophila*, *Sophophora* e *Idiomya* son los más abundantes (Powell, 1997). Dentro del subgénero *Drosophila* está el grupo *mesophragmatica* (Van der Linde y Houle, 2008).

Drosophila es un género muy utilizado en genética experimental debido a ciertas cualidades como sus necesidades alimenticias mínimas, ciclo de vida corto, reproducción exitosa en el laboratorio, descendencia numerosa y además por ser insectos pequeños que no requieren mucho espacio. Por lo tanto las poblaciones de *Drosophila* constituyen un excelente material para estudiar diferentes aspectos de la genética (Rafael y Vela, 2003).

3.2 EL GRUPO *MESOPHRAGMATICA* COMO OBJETO DE ESTUDIO

Dentro de cada género hay subdivisiones como los grupos de especies. Uno de estos grupos es *mesophragmatica* (Brcic y Koref-Santibañez, 1957) que pertenece a la radiación *virilis-repleta* del subgénero *Drosophila*. Este grupo incluye 13 especies neotropicales endémicas del continente Sudamericano, ellas son: *D. altiplanica* Brcic y Koref-Santibañez, 1957; *D. brncici* Hunter y Hunter, 1964; *D. camaronensis* Brcic, 1957; *D. canescens* Duda, 1927; *D. gasici* Brcic, 1957, *D. gaucha* Jaeger y Salzano, 1953; *D. mesophragmatica* Duda, 1927; *D. orkui* Brcic y Koref-Santibañez, 1957; *D. pavani* Brcic, 1957; *D. viracochi* Brcic y Koref-Santibañez, 1957; *D. amaguana* Vela y Rafael, 2004; *D. ruminahuii* Vela y Rafael, 2004; y *D. shyri* Vela y Rafael, 2004. Todas las especies del grupo pueden ser distinguidas por sus características morfológicas externas, con excepción de *D. gaucha* y *D. pavani* que son especies hermanas (Brcic y Koref-Santibañez, 1957; Vela y Rafael, 2004; Mota *et al.*, 2008).

Estas especies viven en los Andes Sudamericanos, con excepción de *D. gaucha* que puede ser encontrada en el sur del Brasil. La configuración del sistema montañoso habría facilitado la especiación rápida ya que da lugar a la formación de poblaciones locales aisladas. El grupo *mesophragmatica* se puede considerar como derivado de un escenario evolutivo ya que sus especies son generalmente alopátricas (Brncic, 1957; Mota *et al.*, 2008). Sin embargo, Céspedes (2010) recientemente encontró viviendo en simpatría a *D. amaguana* y *D. mesophragmatica* y una nueva especie *D. rucux* en la Quebrada de Cruz Loma.

En 1957 Brncic y Koref-Santibañez presentaron una clave basada en características morfológicas externas que permitió la identificación de tres subgrupos dentro de las seis especies. El primer subgrupo contenía una especie con cerdas escutelares anteriores convergentes (*D. viracochi*). El segundo subgrupo presentaba tres especies oscuras con cerdas escutelares anteriores divergentes (*D. mesophragmatica*, *D. orkui* y *D. altiplanica*). El último subgrupo se encontraba compuesto de dos especies de color café claro con cerdas escutelares anteriores divergentes (*D. pavani* y *D. gaucha*). Nacrur (1958) propuso la división de las seis especies conocidas del grupo en dos linajes taxonómicos basado en la dirección de las cerdas escutelares anteriores. En el 2004, Vela y Rafael reconocieron y actualizaron esta propuesta, renombrando los dos subgrupos como subgrupo *viracochi* que abarcaba las especies *D. viracochi* y *D. ruminahuii* y el subgrupo *mesophragmatica* con las once especies restantes (Mota *et al.*, 2008; Vela y Rafael, 2004). Sin embargo, un posterior estudio filogenético de seis de las especies realizado por Mota y sus colaboradores (2008) dividió al grupo *mesophragmatica* en tres linajes. Este estudio se hizo mediante marcadores

nucleares y mitocondriales. El primer linaje está compuesto por *D. viracochi*, en el segundo se encuentran las especies hermanas *D. pavani* y *D. gaucha* y el tercero comprende a *D. gasici*, *D. brncici* y *D. mesophragmatica*. Este estudio también concluye que *D. viracochi* es la primera divergencia del grupo. Ésta y las demás separaciones habrían ocurrido en el Plioceno o Pleistoceno, posiblemente asociados con los refugios glaciares de los Andes (Mota *et al.*, 2008).

Para realizar este estudio se escogió *Drosophila mesophragmatica* por ser una especie del grupo *mesophragmatica* y además porque ha sido registrada en varias provincias del Ecuador y en varias localidades de la Provincia de Pichincha (Vela y Rafael, 2004).

3.3 BIOLOGÍA MOLECULAR, HERRAMIENTA PARA ESTUDIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES

3.3.1 GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones es una ciencia que estudia las fuerzas que dan lugar a cambios evolutivos en las especies a través del tiempo. Se sustenta en las leyes de Mendel y otros principios genéticos aplicados a poblaciones de organismos. Esta ciencia permite aplicar la perspectiva evolutiva en la biología mediante la observación de los cambios genéticos que permiten la evolución (Hartl y Clark, 2007).

Las especies de plantas y animales están estructuradas en poblaciones. Una población es un grupo de individuos que potencialmente pueden aparearse entre sí, pertenecen a la misma especie y viven en un área geográfica restringida (Freeland, 2005). Revelar y entender la estructura genética de las poblaciones es una de las aplicaciones más interesantes y sólidas de la ecología molecular, lo cual permite entender de mejor manera la dinámica de la población, identificar metapoblaciones, estimar las tasas de migración, conocer el flujo génico y observar patrones biogeográficos. El estudio de la estructura genética de cualquier grupo es importante ya que la variabilidad genética nos indica la evolución que han seguido las distintas poblaciones. La variabilidad genética existente nos puede indicar las características que han sido favorecidas por la selección natural, permitiendo establecer la ruta evolutiva que ha seguido cada especie o población (Álvarez, 2002; Beebee y Rowe, 2008).

3.3.2 BIOLOGÍA MOLECULAR COMO HERRAMIENTA

La biología molecular es una herramienta útil para la genética de poblaciones debido a que el estudio de moléculas es una manera eficiente de detectar variación. Sin embargo, la variación molecular que se detecta con estas técnicas no está relacionada con diferencias en el fenotipo entre poblaciones. Por esta razón no se puede especificar exactamente cuales tipos de diferencias moleculares están involucradas en el proceso evolutivo (Hartl y Clark, 2007). Los loci usados en la mayoría de estudios de genética de poblaciones son neutros a la selección natural, por lo tanto las diferencias entre las poblaciones se dan como resultado de la mutación y deriva génica, sin la intervención de

fuerzas selectivas. Así, la interpretación de los datos es más confiable y menos complicada. Además, la variación neutral es un indicador preciso de variabilidad de alelos elevada o no en una población. Una variabilidad elevada es importante para que una especie pueda sobrevivir a presiones selectivas. El análisis de loci es también útil para estudiar la estructura poblacional de una especie en particular (Beebee y Rowe, 2008).

Al hacer un estudio de genética de poblaciones se asume que la cantidad de variación adaptativa en una población se encuentra correlacionada con la cantidad de variación neutral. Esto es importante ya que permite inferir que la variación neutral será un buen indicador de la buena salud genética de una población. Sin embargo, esta correlación no siempre se da. Depende mucho de la especie o especies con las cuales se esté trabajando. Es por esta razón que existen diferentes tipos de marcadores moleculares y se utiliza el más conveniente según el grupo de estudio (Beebee y Rowe, 2008).

Un análisis de genética de poblaciones tiene algunos requerimientos que derivan de la suposición de que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg (HWE por sus siglas en inglés). Estos requerimientos son: que exista panmixia en la población, que los efectos de mutaciones y de migración sean mínimos y puedan ser excluidos del estudio, que el tamaño de la población sea infinitamente grande, que exista herencia mendeliana y por último que no haya selección neutral. Esta suposición de un HWE es útil debido a que desviaciones del mismo pueden ser informativos (Beebee y Rowe, 2008).

Otro asunto importante a tratar cuando se realiza un análisis de genética de poblaciones es que no exista desequilibrio ligado en los loci que se estudian. Este desequilibrio ligado podría darse por proximidad física entre los loci de un mismo cromosoma o por una reciente mezcla de dos poblaciones que no han tenido suficiente tiempo para una asociación independiente entre loci (Beebee y Rowe, 2008).

Una de las preguntas más simples en la genética de poblaciones es si existe una correlación entre el tamaño de la población y la diversidad genética detectable en la naturaleza. Existen evidencias de que las poblaciones grandes tienen más diversidad genética que las pequeñas (Beebee y Rowe, 2008). Otro tema comúnmente investigado es la estructura de las poblaciones. Las herramientas más poderosas para estudiar la estructura poblacional en la gran mayoría de casos son los marcadores moleculares codominantes llamados microsatélites. Los polimorfismos por la longitud de los fragmentos amplificados (AFLPs por sus siglas en inglés) también son ampliamente utilizados con este mismo propósito (Beebee y Rowe, 2008).

Para hacer un estudio de este tipo se deben escoger estrategias adecuadas para el muestreo de las poblaciones que están siendo estudiadas debido a que los recursos usualmente son limitados. De la misma manera se debe definir qué tipo de marcador molecular se utilizará. Un marcador ideal tiene seis características importantes: detecta variación cualitativa o cuantitativa, no muestra influencia del ambiente o de desarrollo, tiene herencia simple codominante, detecta cambios nucleotídicos silenciosos, detecta cambios en porciones codificantes y no codificantes del ADN y detecta cambios evolutivos

homólogos. Sin embargo, ningún marcador tiene todas estas características, es por esto que se escoge el marcador según los beneficios que ofrezca y según el tipo de estudio que se quiera realizar (Lowe *et al.*, 2004).

Los marcadores moleculares son una fuente de información extremadamente útil para los estudios de ecología y genética de poblaciones. Generan datos infinitamente variables de las moléculas de ADN que se encuentran en casi todos los seres vivos. Los seres vivos tienen genomas extremadamente complejos y dentro del genoma existe una diversidad enorme de ADN. Además, no todo el ADN codifica para un producto funcional. La creación de técnicas como la PCR y los *primers* selectivos permiten a los investigadores conseguir abundantes copias de un segmento pequeño y específico con el cual quieran trabajar (Freeland, 2005).

3.5 MICROSATÉLITES

Una de las herramientas más poderosas para estudiar la estructura poblacional en la gran mayoría de casos son los marcadores moleculares llamados SSRs (Simple Sequence Repeats) o microsatélites (Beebe y Rowe, 2008). Un microsatélite es un locus que consiste de secuencias cortas reiteradas llamadas motivos. Estas secuencias cortas son repeticiones en tándem de uno a seis pares de bases, los cuales se encuentran repetidos n veces en una posición cromosomal específica (Freeland, 2005). El polimorfismo es el número de veces que se repite la secuencia corta. Los microsatélites son marcadores que se encuentran tanto en el ADN nuclear como en el ADN de las mitocondrias y cloroplastos

(Awise, 2004). Estos marcadores son codominantes, es decir indican hetero u homocigidad. Esto es importante porque permite un cálculo preciso de las frecuencias alélicas (Freeland, 2005).

Los microsatélites tienen la propiedad de ser variables, y esto se debe a la alta tasa de mutación que poseen comparado con otros marcadores de regiones neutrales del ADN (AFLP, RFLP, RAPD). Su tasa de mutación es de aproximadamente 10^{-3} o 10^{-4} bases por locus por gameto por generación (Awise, 2004; Watson *et al.*, 2007). Ésta es una tasa mucho más elevada que la tasa de mutación general de alrededor de 10^{-9} o 10^{-10} . Debido a esta alta tasa de mutación, la homoplasia de tamaño ocurre frecuentemente. Esto quiere decir que se pueden obtener dos alelos del mismo tamaño en diferentes poblaciones o especies que han tenido diferentes caminos evolutivos para llegar a ese número y que no tienen el mismo alelo ancestral. Por esta razón los microsatélites sólo deben ser utilizados para eventos genéticos recientes en las poblaciones. Por otro lado, debido a su alto nivel de polimorfismo, son muy versátiles para distinguir entre poblaciones e individuos (Freeland, 2005).

Para usar estos marcadores en estudios moleculares el primer paso consiste en la elaboración de *primers*, seguido por la construcción de una biblioteca genómica para la especie en estudio, luego analizar la biblioteca para encontrar clones que contengan microsatélites, secuenciar estos clones y utilizar la información de las secuencias únicas que están a los lados (regiones flanqueantes) de la secuencia del microsatélite para elaborar

los *primers*. Después de obtener los *primers* se realiza la PCR con el protocolo adecuado, se corren las muestras en un gel de poliacrilamida y se interpreta (Awise, 2004).

Las regiones flanqueantes de los microsatélites son las que se utilizan para fabricar los *primers* complementarios que se unirán a ellas y permitirán la amplificación del microsatélite. Una ventaja de estas secuencias adyacentes es que con frecuencia se encuentran conservadas entre especies cercanamente emparentadas. Esto significa que los *primers* pueden en ocasiones ser usados para obtener datos de varias especies (Freeland, 2005).

3.6 ESTADÍSTICOS UTILIZADOS PARA EL ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA POBLACIONAL

3.6.1 ANÁLISIS DE POBLACIONES ÚNICAS

El análisis tanto de cada población individual como de todas las poblaciones de las que se tiene datos en conjunto es interesante. El estudio de cada población es importante porque permite conocer el estado de esa población en cuanto a su diversidad genética. Este es uno de los atributos más importantes de cualquier población ya que el ambiente está en constante cambio y la diversidad genética es necesaria para evolucionar constantemente y adaptarse. Por lo tanto la estimación de la diversidad genética para una población tiene aplicaciones fundamentales para la biología de la conservación (Freeland, 2005).

Existen diferentes tipos de estimadores de la diversidad genética. Uno de los más útiles es la diversidad alélica (d). Este estadístico nos indica el número promedio de alelos por locus en una población. Otro estimador es la heterocigosidad observada (H_o) que se obtiene dividiendo el número de heterocigotos de un locus por el número total de individuos muestreados (Freeland, 2005). Un estimador adicional es el rango alélico (R), que es la diferencia entre el número de repeticiones máxima y mínima en microsatélites. Sin embargo, muchas veces se utiliza otro estadístico en reemplazo de los dos mencionados anteriormente, aquel de la diversidad génica (h) o heterocigosidad esperada. Es más versátil debido a que es menos sensible a efectos de muestreo (como por ejemplo pocos individuos por población). Lo que calcula h es la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar sean diferentes (Freeland, 2005). Se calcula de la siguiente manera:

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

Donde m es el número de haplotipos y x_i es la frecuencia en la muestra del i ésimo haplotipo.

Para el análisis de una población, una de las cosas más importantes que se debe indagar es si la población está en HWE. De esta manera si se sabe la frecuencia de cada alelo en una población, se puede predecir la frecuencia de cada genotipo. Se obtiene así una frecuencia genotípica observada. Para saber si la frecuencia genotípica observada es significativamente diferente de la esperada se utiliza la prueba del Chi cuadrado:

$$X^2 = \sum (O-E)^2 / E$$

Las poblaciones que no estén en HWE también son interesantes para un estudio y se debe indagar por qué no lo están (Freeland, 2005).

Para un estudio de la diversidad genética se debe tomar en cuenta si la población está o no en equilibrio ligado, es decir si el número efectivo de loci usados es igual al número real. Esto solo se dará si existe una segregación independiente (Freeland, 2005).

Existen ciertos factores que influyen en la diversidad genética. Uno de ellos es la deriva génica, es decir cuando existe variación de frecuencias alélicas de una generación a otra debido al azar. Este es un cambio evolutivo no adaptativo y es más fuerte en poblaciones pequeñas en donde se fijan y extinguen alelos rápidamente. Depende del tamaño efectivo de la población, mientras más pequeña sea habrá más fijación de alelos. Otro factor que influye son los cuellos de botella, que es una reducción drástica en el tamaño de la población. Este también es un cambio evolutivo no adaptativo que reduce la diversidad genética y aún cuando el tamaño de la población se ha recuperado, el pool genético sigue bastante reducido (Freeland, 2005).

La selección natural es otro factor de cambio evolutivo. La selección natural es adaptativa ya que da lugar a la reproducción diferencial de individuos genéticamente distintos. Altera las frecuencias alélicas de tal manera que incrementa o disminuye la diversidad según si la selección es estabilizadora, direccional o disruptiva. Por último, el tipo de reproducción también afecta la diversidad genética, ya que la reproducción sexual

genera diversidad y nuevos genotipos durante la recombinación de los cromosomas (Freeland, 2005).

3.6.2 ANÁLISIS DE MÚLTIPLES POBLACIONES

Como se dijo anteriormente, al estudiar una población se obtiene información sobre diferentes procesos evolutivos. Sin embargo para poder entender el proceso evolutivo de las poblaciones también es necesaria información sobre el flujo génico entre poblaciones. Este proceso junto con la deriva génica, la selección natural y las mutaciones actúan en conjunto para determinar si las poblaciones divergen o convergen genéticamente. Las poblaciones de una misma especie van a variar genéticamente y existen ciertos métodos para analizar datos genéticos que permiten determinar si las poblaciones son o no genéticamente distantes unas de otras (Freeland, 2005).

El modelo más común para cuantificar la diferenciación genética son los F-estadísticos. Estos usan coeficientes de endogamia para describir la partición de la variación genética dentro y entre poblaciones y puede ser calculada en tres niveles. F_{IS} mide el grado de endogamia dentro de individuos con respecto a su población. Refleja la probabilidad de que dos alelos dentro del mismo individuo sean idénticos por descendencia. Se calcula de la siguiente manera:

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

Donde H_S son los heterocigotos esperados bajo HWE y H_I los heterocigotos observados (Freeland, 2005). Este coeficiente (F_{IS}) permite evaluar si existe apareo al azar (Balloux y Moulin, 2002). F_{ST} es otro estadístico que provee un estimado de la diferenciación genética entre poblaciones. Mide el grado de endogamia dentro de una población en relación al total de las poblaciones. Refleja la probabilidad de que dos alelos escogidos al azar de una subpoblación sean idénticos por descendencia. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

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

Donde H_T es la heterocigosidad esperada del total de la población. De esta manera un valor de 0 indica poca o ninguna diferenciación genética y un valor de 1 una total diferenciación genética. Sin embargo, para ver si el F_{ST} es significativo se utiliza una permutación que reparte genotipos entre las poblaciones de individuos al azar miles de veces y calcula el F_{ST} para cada permutación. El valor P de la prueba se basa en el número de veces que los valores F_{ST} son iguales o mayores a aquellos calculados de los datos. Esto significa que aún teniendo un valor bajo se puede concluir que existe una diferenciación genética importante y por lo tanto una cierta estructuración poblacional. Por último existe el coeficiente F_{IT} que provee un coeficiente de endogamia para un individuo al medir la heterocigosidad del individuo relativo al de todas las poblaciones. Se calcula con la fórmula a continuación:

$$F_{IT} = (H_T - H_I) / H_T$$

La relación entre los tres es: $F_{IT} = F_{IS} + F_{ST} - (F_{IS})(F_{ST})$ (Freeland, 2005).

Los valores theta son también estimadores de la diversidad molecular. Usualmente se calcula:

$$\Theta = 4N(e)\{\mu\}$$

donde $N(e)$ es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación por gen por generación. Sin embargo para los microsatélites se ha desarrollado Theta (H), que es un estimado de theta obtenido a partir de la homocigosidad observada, se calcula de la siguiente manera:

$$\hat{\theta}_H = \frac{1}{(1 - \hat{H})^2} - 1,$$

Tomado de Manual Arlequín

Donde \hat{H} ($= h$) es la heterocigosidad esperada cuya fórmula se encuentra descrita en la sección anterior (Excoffier *et al.*, 2005).

Una técnica para el estudio de la variación molecular dentro de una especie es el Análisis de Variación Molecular (AMOVA por sus siglas en inglés). Con este análisis los datos obtenidos de los marcadores se incorporan a una matriz especial y el AMOVA produce estimados de componentes de variación y análogos de las F-estadísticas. De esta manera refleja la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisiones jerárquicas (es decir dentro de la población, entre poblaciones y entre regiones). El método puede acomodar diferentes tipos de matrices y datos moleculares y diferentes tipos de supuestos evolutivos sin modificar la estructura básica del análisis. La significancia de la prueba se calcula utilizando permutaciones (Excoffier *et al.*, 1992).

El flujo génico es un proceso evolutivo importante para las poblaciones ya que influye en el tamaño de la población, diversidad génica, adaptación local y especiación. Además, es la fuerza que mantiene interconectadas a diferentes poblaciones de una especie,

es decir es determinante para la estructura poblacional (Freeland, 2005, Prat *et al.*, 2006). Este proceso reduce la tasa de deriva génica y previene subdivisiones poblacionales substanciales. Su cuantificación es difícil, existen tres métodos de los cuales dos son factibles para el presente estudio. El primero es utilizando el F_{ST} debido a que se demostró que existe una relación entre la divergencia genética entre dos poblaciones y la cantidad de flujo génico entre ellas:

$$F_{ST} = 1 / (4N_e m + 1)$$

$N_e m$ siendo el número de adultos que son migrantes.

$$N_e m = (1 / F_{ST} - 1) / 4.$$

El otro método es asignar individuos a su población de origen más probable comparando su genotipo con los perfiles genéticos de varias poblaciones. Por último existe la prueba Mantel que analiza si existe una correlación entre la distancia geográfica y la genética. De esta manera se puede saber si existe un aislamiento por distancia, es decir que mientras más alejadas se encuentren las poblaciones, menos flujo génico habrá (Freeland, 2005).

Una técnica para visualizar las similitudes y diferencias de los datos es el análisis de coordenadas principales (PCoA por sus siglas en inglés). Lo que hace el PCoA es usar una matriz de similitud o disimilitud y asignar una ubicación en un espacio dimensional a cada ítem, obteniéndose un gráfico. Para realizar este gráfico se realiza un análisis eigen en el cual se calcula una serie de valores y vectores eigen a partir de la matriz triangular. Cada variable en el análisis (en este caso cada población) se representa como un vector. Se grafica a todos los vectores con su ángulo y longitud correspondiente. Su magnitud será equivalente al grado de correlación de cada población relativo al eje principal. El gráfico

que se obtiene permite visualizar diferencias entre individuos o grupos de individuos (SequentiX, en línea, 2006).

3.7 INVESTIGACIONES RELACIONADAS E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

3.7.1 ESTUDIOS DE *D. MESOPHRAGMATICA* Y DE ESTRUCTURA POBLACIONAL EN *DROSOPHILA*

Los estudios con *D. mesophragmatica* y del grupo *mesophragmatica* son relativamente pocos. Los primeros trabajos son los de Brncic y Koref-Santibañez en 1957 y Brncic en 1957. El primer trabajo trata sobre la descripción morfológica de cada especie del grupo y sus posibles relaciones filogenéticas y el segundo es un estudio comparativo de la variación cromosomal en el grupo. Los dos trabajos son importantes hasta ahora para la identificación de diferentes especies del grupo. Poco tiempo después se publicaron dos estudios sobre el aislamiento sexual y cortejo en el grupo (Koref-Santibañez *et al.*, 1958 y Koref-Santibañez, 1963), los cuales proveen ideas sobre las barreras reproductivas en el grupo y la forma de los *genitalia*. En el 2004 Vela y Rafael publican un artículo en el que describe tres nuevas especies pertenecientes al grupo *mesophragmatica*. Este estudio es importante porque describe especies que habitan los Andes ecuatorianos. En el 2006 sale a la luz el primero estudio molecular del grupo, y trata sobre los elementos transponibles, utilizando las técnicas de Dot Blot y PCR (Germanos *et al.*, 2006). Este estudio concluye que existen abundantes elementos transponibles en el grupo. Luego Mota *et al.* realizaron un estudio sobre la filogenia del grupo en el 2008 mediante el secuenciamiento de 5 genes y

su comparación con las diferentes especies. Este estudio es importante, permite entender el parentesco existente entre las especies del grupo.

Se ha realizado varios estudios sobre la estructura poblacional en otras especies de *Drosophila*. En 1999 Hamblin y Veuille secuenciaron dos loci nucleares en 4 poblaciones distintas para investigar la estructura poblacional de *D. simulans* de África. Ellos encontraron evidencia de un cuello de botella reciente de las poblaciones y de una selección direccional. Cobb *et al.* en el 2000 realizaron un estudio utilizando 8 microsatélites en 5 poblaciones de *D. teissieri* para medir los efectos de la fragmentación del bosque en la variación molecular. Ellos hallaron una diferencia significativa en la variación de las distintas poblaciones. En el 2001 Agis y Schlötterer investigaron la estructura poblacional de *D. melanogaster* en la costa este Australiana. Estos autores analizaron 10 poblaciones y 48 microsatélites y descubrieron una alta variación de alelos por locus pero una baja divergencia genética entre las diferentes poblaciones. En el 2002 Frydenber *et al.* estudiaron la variación genética en *D. buzzatii*. Ellos trabajaron con 10 microsatélites en 5 poblaciones y encontraron que dos poblaciones eran naturales y tres colonizadoras provenientes de Europa y Australia. Además descubrieron que la variación alélica es significativamente mayor en las poblaciones naturales debido al efecto fundador en las poblaciones colonizadoras. Dieringer *et al.*, (2005) analizaron la estructura genética de poblaciones de *D. melanogaster* en África. Para ellos usaron 17 microsatélites de 13 poblaciones y detectaron dos grupos claramente distinguibles. En el 2006 Ross y Markow, estudiando la variación microsatelital en poblaciones divergentes de *D. mojavensis*,

encontraron que las cuatro regiones geográficas distintas tienen una diferenciación genética significativa entre ellas y aislamiento reproductivo.

3.7.2 TRANSFERIBILIDAD DE MICROSATÉLITES

Los microsatélites son uno de los marcadores genéticos más populares para estudios de ecología molecular. Se necesita cada día más marcadores que pueden ser transferidos entre especies. Esto es importante porque muchas especies necesitan ser estudiadas de manera comparativa. La deforestación y el desarrollo urbano están reduciendo aún más los fragmentos de los bosques rápidamente. Además, es importante el desarrollo de marcadores transferibles para especies del trópico y endémicas ya que éstas se encuentran poco representadas. Esto es alarmante porque las especies del trópico son las más abundantes y aquellas que son endémicas, por el mismo hecho de serlo, son muy importantes para la biología de la conservación. Por lo tanto es de gran importancia encontrar microsatélites que sirvan para grupos enteros de especies (Barbará *et al.*, 2007).

La transferibilidad de microsatélites entre especies es, sin embargo, más limitada de lo que los científicos quisieran creer. En artrópodos hay un buen porcentaje de transferibilidad entre especies de un mismo género, pero ya entre géneros o entre familias el porcentaje de microsatélites que amplifiquen es muy bajo. Es más difícil la transferencia de microsatélites en este grupo de especies que en otros por su tiempo generacional corto (Barbará *et al.*, 2007).

Los marcadores moleculares en *Drosophila*, y específicamente los microsatélites, han sido desarrollados principalmente para especies del subgénero *Sophophora*. Esto se debe a que *Drosophila melanogaster*, especie modelo en estudios genéticos y de desarrollo, pertenece al subgénero *Sophophora* y los estudios moleculares han sido principalmente orientados a esta especie y a especies cercanas. *D. mesophragmatica* no pertenece al mismo subgénero, por ello las opciones de escoger primers de microsatélites diseñados para especies cercanas a la estudiada son bastante limitadas (Tweedie *et al.*, 2009). A pesar de que las opciones sean limitadas, sí existen *primers* de microsatélites desarrollados para algunas especies de grupos hermanos del grupo *mesophragmatica*, como es el caso de *D. mojavensis*, *D. virilis*, *D. arizonae*, *D. pachea*, *D. neotestacea*, *D. recens*, entre otras (Ross *et al.*, 2003).

3.7.3 IMPORTANCIA Y OBJETIVO DEL ESTUDIO

La mayoría de los estudios sobre estructura poblacional mencionados en la sección anterior se realizaron con especies bastante estudiadas, con *primers* específicos para la amplificación de microsatélites. En los casos en los que no se dispone de *primers* específicos para la especie, se realiza la secuenciación y se fabrica *primers* a partir de las secuencias de las regiones flanqueantes. Los estudios utilizando técnicas moleculares dentro del grupo *mesophragmatica* son muy pocos. Nunca antes se había trabajado con microsatélites dentro del grupo, por lo tanto no se ha desarrollado ningún *primer* específico para la especie, lo cual obliga a desarrollar estudios previos de transferibilidad de marcadores hacia la especie en estudio. La mayoría de estudios que se enfocan en la

transferibilidad de microsatélites son realizados con el objetivo de caracterizar los microsatélites de una especie a otras especies más no de determinar la estructura poblacional en la especie target (Barbará *et al.*, 2007). El presente trabajo es por lo tanto un estudio pionero dentro del grupo *mesophragmatica*. Es además un estudio de gran interés porque considera la transferibilidad de microsatélites de una especie a otra así como su estructura poblacional con los microsatélites transferidos. El conocimiento de la estructuración de la población provee guías importantes para estrategias de conservación y manejo de poblaciones al indicar qué tan variables son las poblaciones, cuánto flujo génico existe entre ellas, qué tan fuerte es la deriva génica, entre otros factores (Balloux y Moulin, 2002). Adicionalmente el presente estudio permitió dilucidar la dinámica genética en *D. mesophragmatica*.

El objetivo del presente estudio es aportar al conocimiento de la dinámica poblacional de *D. mesophragmatica* mediante un estudio molecular. Para ello, en primer lugar, se realizó la transferencia de primers de microsatélites desde la especie *D. mojavenis* a *D. mesophragmatica*. En segundo lugar se analizó la estructura genética de seis poblaciones de *D. mesophragmatica* de la Provincia de Pichincha, dos poblaciones de la Cordillera Occidental, dos poblaciones del Valle Interandino y dos poblaciones de la Cordillera Oriental.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS

4.1.1 SALIDAS DE CAMPO

Se estudiaron seis poblaciones provenientes de la Provincia de Pichincha, dos de la cordillera occidental de los Andes: Lloa (L) y Quebrada Cruz Loma (T; loma al norte del Teleférico de Quito); dos del valle interandino: Monteserrín bajo (M; El Quinche) y Pasochoa (P); y dos de la cordillera oriental de los Andes: Peñas Blancas (C; vía a Papallacta) y Antisanillo (A; vía a Antisana) (Figura 1).

Para capturar *D. mesophragmatica* se colocó de 20 a 60 trampas en cada lugar. Se dejaron las trampas (con cebo de banano fermentado con levadura) colgadas en los árboles o arbustos durante 2 y 3 semanas. Las trampas consistían de una botella de plástico de medio litro con huecos por donde ingresaban las moscas, mismas que fueron cubiertas por capuchones para evitar su inundación (Anexo 1). Los capuchones fueron fabricados con botellas plásticas grandes de 3 litros cortados en un extremo.

Para la captura se cubría la trampa con una bolsa negra teniendo cuidado de tapar los huecos. Se abría la tapa y se colocaba un tubo vacío o con medio de cultivo en la abertura de la botella. Las moscas vivas volaban hacia la luz. Las moscas que no lo hacían fueron capturadas con un aspirador. Las moscas muertas en el cebo de la botella se

guardaron en alcohol al 70% para preservarlas. Cuando no se obtenía la cantidad de individuos necesaria, es decir 20, se volvía a la tercera semana para realizar otra captura.

En cada localidad se dejó dataloggers de marca HOBO[®] Pro v2 programados para medir la humedad y la temperatura cada dos horas el mismo día que se dejó las trampas. Los dataloggers se recogieron en la primera o segunda recolecta, dependiendo del momento en el que se encontraron individuos de la especie estudiada.

4.1.2 FASE DE LABORATORIO

En el laboratorio se identificó morfológicamente las moscas vivas con la ayuda de un esteromicroscopio. Las características utilizadas fueron el patrón de bandas en la parte dorsal del tórax, las cerdas escutelares anteriores que deben ser divergentes, y la vena transversal posterior rodeada por un halo oscuro (Anexo 2). Se guardó a los machos identificados morfológicamente como *D. mesophragmatica* en tubos esterilizados de 0,5ml con alcohol al 70%, que fueron debidamente etiquetados. Se procedió a examinar los *genitalia* de los machos para verificar la identidad de *D. mesophragmatica*. Para ello se retiró el último segmento abdominal del individuo y se lo colocó en KOH 10% en un tubo eppendorf de 1,5ml y se hirvió en baño maría durante 7 minutos. Luego, con la ayuda de un estereomicroscopio, se separó las estructuras de los *genitalia*. El preparado fue observado en un microscopio y lo cual confirmó la identidad de *D. mesophragmatica* (Anexo 3).

Las hembras capturadas en la naturaleza no se las pudieron utilizar directamente para el estudio ya que usualmente vienen fecundadas del campo, por lo tanto al realizar una amplificación de su ADN se estaría amplificando más de un genoma. Las hembras capturadas que fueron identificadas morfológicamente como *D. mesophragmatica* se sembraron en tubos para obtener descendencia F1. Luego se tomó un macho F1 de cada hembra sembrada y se analizó los genitalia para verificar la identidad de la especie. Posteriormente se lo guardó en alcohol al 70%.

4.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN con un protocolo estándar de fenol-cloroformo que es ampliamente usado en la extracción del ADN de insectos (Anexo 4). El método ha sido ligeramente modificado en el laboratorio de Genética Molecular de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. En el protocolo modificado no se utilizó fenol, sino alcohol isoamílico ya que este producto sirve con la misma eficiencia que el fenol y tiene la ventaja de ser menos tóxico. Otra modificación es que se añadió RNAsa A a las muestras para digerir el ARN y obtener un ADN más puro.

Las moscas fueron maceradas en un buffer de lisis altamente salino que permitió la ruptura de la membrana celular para extraer los productos celulares. Se añadió la enzima proteinasa K para digerir las proteínas de la mosca y se incubó a 50°C que es la temperatura óptima de acción de esta enzima. Se añadió igualmente la enzima RNAsa A para digerir el ARN de la muestra. Luego se incubó por una hora. Luego se añadió cloroformo alcohol

isoamílico y se centrifugó, obteniéndose un precipitado de polisacáridos, proteínas y otros productos celulares, y en el sobrenadante los ácidos nucleicos. Se tomó solamente el sobrenadante y se repitió el proceso. Posteriormente se realizaron lavados con etanol a diferentes concentraciones para lograr una precipitación del ácido nucleico y lavar todas las impurezas para obtener un ADN en buenas condiciones. Se dejó evaporar todo el etanol y se resuspendió el ADN en agua ultrapura.

4.3 ESTANDARIZACIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES MEDIANTE PCR

Los microsatélites que se utilizaron provienen del estudio de Staten *et al.*, (2004) en el cual obtuvieron varios microsatélites de *D. mojavensis*, especie emparentada a *D. mesophragmatica*. Se realizaron ensayos de transferibilidad de estos microsatélites desde *D. mojavensis* hacia *D. mesophragmatica*. Para ellos se mandó sintetizar 24 pares de *primers* a Invitrogen® Carlsbad, California. Después de aproximadamente un mes se recibió los *primers* en estado liofilizado. Para almacenar, a la solución madre se la diluyó a una concentración de 100µM. Esto se realizó multiplicando por 10 los nMoles de cada *primer* y el número obtenido fue el número de µl de agua ultrapura añadidos al *primer* liofilizado. Una vez diluido, se dejó reposar para que se diluya bien durante aproximadamente dos horas. Pasadas estas dos horas se fabricaron alícuotas de cada *primer*. Para hacerlo se tomó 10 µl de la solución madre se los mezcló con 90 µl de agua ultrapura. Así se obtuvieron alícuotas a 10µM que se almacenaron en la congeladora de -4°

mientras que las soluciones madres fueron selladas con parafilm y mantenidas en la congeladores de -20° para evitar su degradación y contaminación.

Se realizaron las reacciones PCR, cada una de 15 μ l y con 1X de buffer, 0,2mM dNTPs, 1,5mM $MgCl_2$, 1U *Taq* polimerasa, 0,5 μ M de *primer* forward y 0,5 μ M de *primer* reverse. Para obtener un producto óptimo, se ensayó diferentes condiciones como la temperatura de anillamiento, concentración de $MgCl_2$, concentración de *primer*, número de ciclos y por último se realizó PCRs touchdown en los cuáles se baja la temperatura de anillamiento cada cierto número de ciclos. De los 24 pares de marcadores, solamente se logró una amplificación y lectura clara de 5 pares. Estos fueron amplificados con diferentes condiciones en cuanto a la temperatura de anillamiento y el número de ciclos por cada temperatura para identificar con cuál combinación se obtenía el producto más claro posible.

4.4 VISUALIZACIÓN EN GELES DE POLIACRILAMIDA E INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS

Una vez efectuada la amplificación, se realizaron corridas de ensayo de algunos amplificados en geles de poliacrilamida. Los amplificados utilizados tenían diferentes concentraciones de formamida y se varió igualmente el tiempo de corrida para obtener una combinación que permita una lectura de las bandas lo más precisa posible. Cuando se obtuvieron las condiciones óptimas, se corrieron todos los amplificados en geles de poliacrilamida 6%, 5M úrea. Para hacer el gel se siguió el protocolo del Anexo 5 que es un protocolo estándar para la electroforesis vertical con las respectivas modificaciones

realizadas en el Laboratorio de Genética Molecular de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. El gel, una vez fabricado y polimerizado, se lo limpió y ubicó en una cámara de electroforesis vertical. Se llenó la cámara de TBE 1X y se realizó una precorrida a una potencia eléctrica de 65W durante una hora para que se caliente el gel. Mientras se desarrollaba esta precorrida, se añadió formamida (en concentraciones de ADN:formamida 1:1 o 1:0,5) a los amplificados y se denaturó cada muestra a 95°C durante 4 minutos. A la escalera utilizada (10bp DNA *ladder* de Invitrogen®) también se le añadió formamida (ladder:formamida 1:20) y se lo denaturó a 72°C durante 5 minutos. Cuando finalizó la precorrida se colocó un peine de 68 pocillos en el frente de migración del gel. Se cargó entre 2 y 3µl de la muestra en cada pocillo dependiendo del marcador. Se cargó igualmente por lo menos dos pocillos con 2 µl de la escalera (Anexo 8).

Una vez terminada la corrida del gel, se procedió con la tinción de plata que se encuentra detallada en el Anexo 5. Luego de la tinción, se dejó secar el vidrio y se analizó las bandas presentes en cada individuo. Para saber a qué alelo correspondía cada banda lo primero que se hizo fue medir diferentes puntos de la escalera de 10pb en centímetros y ver a cuántas pares de bases correspondía esta medición. Todo esto se anotó y con estas dos variables se realizó un gráfico de dispersión en Microsoft Office Excel 2007, la variable independiente siendo el número de pares de bases y la variable dependiente la distancia corrida en centímetros. Se agregó la línea de tendencia y su ecuación. Luego se midió cada banda presente en el gel y se utilizó la ecuación para saber a cuántas pares de bases correspondía. Se reemplazó la distancia corrida en centímetros en la x de la ecuación para

obtener el número de pares de bases y así saber a qué alelo correspondía cada banda. Los resultados de este proceso se encuentran en la base de datos del Anexo 6.

4.5 ANÁLISIS DE LOS DATOS

En primer lugar se realizó un análisis de diversidad genética intrapoblacional y variancia genética interpoblacional con cada marcador, cada pareja de marcadores, cada trio de marcadores, cada cuarteto de marcadores y por último los cinco marcadores juntos. El índice utilizado para medir la diversidad genética intrapoblacional fue la heterocigosidad esperada (h) y el estadístico utilizado para medir la variancia genética interpoblacional fue Theta (H). En cada caso se realizó gráficos que muestran la cifra para cada una de las combinaciones de marcadores descritas y gráficos que muestran un promedio de los valores para cada tipo de combinación, es decir con un marcador, con dos marcadores, con tres marcadores, con cuatro marcadores y con cinco marcadores. Este análisis se realizó con el objetivo de determinar si con el número de marcadores utilizados se lograba obtener un valor representativo de la variabilidad genética de la población, y por lo tanto si era suficiente para poder realizar los diferentes análisis que se describen a continuación.

El análisis de los datos obtenidos se realizó con el programa Arlequin 3.5. Este programa de análisis de datos se aplica a la genética de poblaciones y fue desarrollado por Excoffier y colaboradores (2005). Su objetivo es proveer al usuario con pruebas y métodos estadísticos para que se pueda extraer información genética y demográfica de la serie de muestras de una población. Las pruebas estadísticas que utiliza son realizadas para

minimizar los supuestos y ser lo más poderosas posible. Maneja datos genéticos bajo varias formas diferentes y se realiza los mismos tipos de análisis sin importar el formato usado (Excoffier *et al.*, 2005; Prat *et al.*, 2006).

Los primeros análisis realizados fueron los intrapoblacionales. Entre estos los análisis básicos como número de alelos por locus, frecuencia alélica por locus por población y alelos únicos. También se estimó parámetros de diversidad estándar y molecular como la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (h), diversidad alélica (d) y rango alélico (R). Luego se realizó análisis para probar la existencia o no de equilibrio Hardy-Weinberg por locus por población con una versión modificada del algoritmo de la cadena Markov. Se analizó igualmente la existencia o no de desequilibrio ligado utilizando 1000 permutaciones para analizar la significancia del análisis.

Al nivel interpoblacional, se calculó los estadísticos F_{IS} y F_{IT} . Luego se procedió con los análisis de distancia genética mediante el cálculo de los F_{ST} de cada pareja de poblaciones. Se realizaron 10000 permutaciones de F_{ST} para ver si la distancia genética obtenida era estadísticamente significativa.

Una vez que se tenía la matriz de los F_{ST} por parejas, se modificó la base de datos existente para incluir esta matriz y una matriz de las distancias geográficas entre cada población. Las distancias geográficas lineales fueron calculadas con las coordenadas de cada población en el sitio web <http://jan.ucc.nau.edu/~cvm/latlongdist.html>. Estas distancias, en kilómetros, fueron convertidas a logaritmo natural y se fabricó la matriz de

distancias entre parejas de poblaciones (Agis y Schlötterer, 2001). Con estas dos matrices se pudo realizar la prueba de Mantel que calcula la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica (Freeland, 2005). Se realizaron 1000 permutaciones para saber la significancia de la correlación. Un análisis de variancia molecular AMOVA, locus por locus, fue efectuado con el objetivo de dilucidar a qué nivel jerárquico corresponde la mayor parte de la variación y complementar así los resultados obtenidos con el F_{ST} . En este caso igualmente se hicieron 1000 permutaciones para conocer la significancia del AMOVA (Excoffier *et al.*, 2005).

Un último análisis fue efectuado con el programa GenAlEx 6 (Peakall y Smouse, 2006) a partir de los F_{ST} calculados con el programa Arlequin 3.5. Este análisis fue un PCoA y se lo realizó con el objetivo de visualizar los patrones obtenidos en la matriz de distancia genética obtenida a partir de los F_{ST} de cada pareja de poblaciones.

Cuando se realizaron pruebas de significancia, se tomó a los datos como significativos si P era menor a 0,05 y como altamente significativos si P era menor a 0,01.

5. RESULTADOS

5.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y LOCALIDADES

Se realizó un total de 21 salidas al campo, 6 de ellas para la puesta de trampas y las 13 restantes para las capturas de drosófilas en 6 localidades (Lloa, Quebrada Cruz Loma, Monteserrín Bajo, Pasochoa, Peñas Blancas, Antisanillo). La mayoría de localidades necesitaron entre dos y tres colectas para obtener la cantidad de individuos necesarios para el estudio. En 5 de las 6 poblaciones se logró obtener 20 machos para el estudio, en la única localidad donde esto no fue posible fue en el Pasochoa, solamente se utilizó 9 individuos de esta población para el estudio (Tabla 1). Las coordenadas y la altura de cada localidad se pueden visualizar en la Tabla 2.

La temperatura promedio va desde los 7,5° hasta los 13,2°C y la humedad relativa varía desde 73,7% hasta 86,2%. Se calculó el promedio para cada una de las localidades utilizando todas las medidas de temperatura y humedad relativa empezando un día después de la colocación de las trampas hasta el día de la colecta (Tabla 3). Se realizó una prueba de correlación entre la temperatura y humedad relativa y se obtuvo un R^2 de 0,3179, lo cual indica que no existe correlación entre estos dos factores (Anexo 7).

5.2 AMPLIFICACIÓN

De los 24 pares de *primers* probados, 17 dieron señales de amplificación, es decir el 70,8%. Sin embargo de estos 17 *primers*, 7 dieron un patrón de bandas múltiples, 4 dieron

una señal demasiado leve, casi imperceptible, por lo tanto su lectura no fue posible. 6 *primers* dieron lugar a una amplificación correcta con una buena señal pero uno de estos era monomórfico entonces no pudo ser utilizado para el estudio. Solamente 5 loci pudieron ser leídos para el estudio, es decir un 20,8% de los microsátélites pudieron ser transferidos a *D. mesophragmatica* (Tabla 4). Estos cinco fueron DMOJ3101 (llamado de ahora en adelante 3101), DMOJ3030 (3030), DMOJ5200 (5200), DMOJ2302 (2302), DMOJ3020 (3020) (Staten *et al.*, 2004). El protocolo utilizado para su amplificación así como las condiciones de su corrida fueron modificados después de numerosos ensayos. Las condiciones con las cuales se obtuvo el mejor resultado para una lectura correcta de las bandas están detalladas en la Tabla 5. Algunos gráficos de los geles pueden ser visualizados en el Anexo 8, ellos muestran los alelos encontrados en las diferentes poblaciones.

La lectura de los geles dio como resultado la base de datos que se encuentra en el Anexo 6. Esta base de datos fue exportada a Arlequin 3.5 utilizando el programa GenAlEx 6.

5.3 ANÁLISIS INTRAPOBLACIONALES

En cuanto a las comparaciones realizadas para saber si el número de marcadores utilizados era adecuado, tanto la diversidad genética promedio (h) (Figura 2 y 3) como la variancia genética promedio estimada con Theta (H) (Figura 4 y 5) muestran valores que se van estabilizando mientras más marcadores se toman en cuenta. Al llegar al valor de 4 y 5 marcadores, los dos índices se muestran estables.

El número de alelos por locus varía considerablemente, desde tres alelos en el locus 3030 hasta quince alelos en el locus 2302 con un promedio de 8,2 alelos (Tabla 6). En cada locus hay un alelo que se encuentra con más frecuencia en por lo menos tres poblaciones y a veces incluso en las seis, lo cual se revela en las tablas del Anexo 9. Al observar la Figura 6 en donde se muestra en el número de alelos por locus según la población se nota que el patrón es relativamente homogéneo en todas las poblaciones.

Existe una cantidad numerosa de alelos únicos, como se evidencia en la Tabla 7. Hay por lo menos un alelo único por cada población con la excepción de Pasochoa (P). Las poblaciones de Peñas Blancas (C) y Lloa (L) tienen dos alelos únicos cada una y la población Quebrada Cruz Loma (T) tiene 4 alelos únicos.

La variabilidad genética de cada población se puede evidenciar con diferentes cálculos como aquel de la heterocigosidad observada, la heterocigosidad esperada, el número de alelos por locus promedio y el rango alélico promedio. Los resultados de estos cálculos se encuentran en detalle en el Anexo 10. La Tabla 8 es un resumen del promedio de todos estos cálculos para cada población. La heterocigosidad observada es relativamente uniforme en todas las poblaciones, aunque la población de Antisanillo tiene un heterocigosidad un poco más baja mientras que la población de Peñas Blancas tiene una heterocigosidad promedio un poco más alta. La heterocigosidad esperada o diversidad genética promedio igualmente es homogénea. El único valor destacable es aquel de Pasochoa que es más elevado que el resto de poblaciones. La diversidad alélica promedio

es similar en las seis poblaciones, mientras que el rango alélico promedio es relativamente uniforme, sin embargo este valor es ligeramente más pequeño en la población de Peñas Blancas y ligeramente más alto en la población de Pasochoa.

El cumplimiento o no del equilibrio Hardy-Weinberg puede ser evidenciado en la Tabla 9, que es un resumen del Anexo 11. De los 5 loci estudiados, solamente dos de ellos (3030 y 2302) cumplen con HWE en la mayoría de poblaciones. Los otros tres loci (3101, 5200 y 3020) no cumplen con HWE en la mayoría de poblaciones. En cuanto a las poblaciones, como se puede ver en el Anexo 11, en la población Antisanillo (A) en tres de los loci la desviación es altamente significativa. Las demás poblaciones tienen por lo menos un locus con una desviación altamente significativa y uno con una desviación significativa, en la mayoría de casos más de dos loci se encuentran desviados del equilibrio H-W.

Los resultados de las pruebas de desequilibrio ligado se encuentran expuestos en el Anexo 12, los cuales se están resumidos en la Tabla 10. Se encontró una significancia en el desequilibrio ligado para tan solo tres pares de loci, 2302 con 5200, 5200 con 3020 y 3020 con 3030. Esta significancia estuvo presente en una sola población para cada caso. Se puede por lo tanto afirmar que no existe desequilibrio ligado entre los loci estudiados.

5.4 ANÁLISIS INTERPOBLACIONALES

Los análisis de endogamia F_{IS} y F_{IT} son los primeros resultados interpopulacionales que se presentarán (Tabla 11). En estos casos los valores pueden ser desde -1 hasta 1, el -1

indica que todos los individuos son heterocigotos y el 1 que no existe heterocigotidad. El F_{IS} mide el grado de endogamia de individuos respecto a su población. Los valores obtenidos están en un rango de 0,028 a 0,234. Esto nos indicaría una heterocigotidad promedio en las poblaciones, sin embargo según el análisis de significancia se obtuvo una ausencia de heterocigotidad altamente significativa en la población de Antisanillo (A) y una ausencia de heterocigotidad significativa en las poblaciones Quebrada Cruz Loma (T) y Pasochoa (P). El análisis F_{IT} mide la endogamia de cada individuo respecto al total de poblaciones, se obtuvo un valor promedio 0,16627 para todos los individuos de. Esto igualmente indicaría una heterocigotidad promedio de cada individuo respecto al total de las poblaciones.

Para analizar la diferenciación genética entre poblaciones se midió el F_{ST} entre cada par de poblaciones. Se obtuvo valores entre 0,024 y 0,081, los cuales indican una diferenciación genética leve (cuando F_{ST} se encuentra entre 0 y 0,05) en cuatro de las comparaciones y una diferenciación genética moderada (cuando F_{ST} se encuentra entre 0,05 y 0,25) en el resto de comparaciones (Freeland, 2005). En el Anexo 13 se encuentran los valores de F_{ST} y un gráfico explicativo. Al observar el Anexo 13 y la Tabla 12 se destaca que los valores F_{ST} para las poblaciones Pasochoa-Peñas Blancas, Lloa-Monteserrín Bajo, Quebrada Cruz Loma-Antisanillo y Quebrada Cruz Loma-Monteserrín Bajo son los más bajos mientras que los valores F_{ST} para las poblaciones Monteserrín Bajo-Pasochoa y Quebrada Cruz Loma-Pasochoa son los más altos. Al realizar 10000 permutaciones y ver la significancia obtenemos valores significativos de F_{ST} en todas las comparaciones con la

excepción de Pasochoa-Peñas Blancas. Tanto la tabla de valores de P como su tabla respectiva de significancia se puede observar en el Anexo 14.

La prueba de Mantel, utilizada para saber si existe correlación entre la distancia genética y geográfica, se realizó a partir de las distancias geográficas entre cada par de poblaciones (Tablas 13 y 14). Dio como resultados un coeficiente de correlación (R) con un valor de -0,017 y al realizar las pruebas de significancia se obtuvo un valor de 0,48 (Anexo 15). El coeficiente de correlación bajo y su falta de significancia implica que no existe una correlación entre las distancias genéticas y geográficas.

Al realizar una PCoA vía matriz de covariancia sin estandarización de datos usando como variable los F_{ST} obtenidos para cada pareja de poblaciones se obtuvo el gráfico que se puede observar en la Figura 7. Este gráfico ubica a las poblaciones según su distancia genética. Se observa una distribución heterogénea de las poblaciones, en donde la población Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín bajo (M) son las más cercanamente ubicadas mientras que Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C) se encuentran igualmente cercanas. Tanto Antisanillo (A) como Lloa (L) se encuentran lejanas de las demás poblaciones y entre sí. El porcentaje de variación explicado por los ejes es el 80,85%.

Un AMOVA (análisis de variancia molecular) fue realizado para distinguir en donde se ubica la mayor variación genética. Los resultados del AMOVA se pueden visualizar en la Tabla 15. La variación genética se encuentra en un 94,26% dentro de las poblaciones y en un 5,74% entre poblaciones. Estos datos son altamente significativos.

6. DISCUSIÓN

6.1 LOCALIDADES Y MUESTRAS OBTENIDAS

La obtención de muestras fue un proceso que tomó tiempo y planificación ya que aún no existe un registro preciso de la distribución de la especie estudiada. A lo largo de esta tesis se pudo observar que *D. mesophragmatica* efectivamente se encuentra en las estribaciones de los Andes entre los 2 700 y 3 600 msnm. La temperatura promedio es baja (7 a 13°C) ya que son poblaciones que se encuentran en la montaña a una altura considerable (Tabla 3). En una montaña, la temperatura del aire baja aproximadamente 6,5°C por cada 1 000 m de altura, por esta razón tenemos una temperatura baja. Además se observa una fuerte diferencia entre la temperatura de la noche y del día. Esto se debe a que el aire de la montaña tiene menos partículas y retiene menos energía del sol que el aire al nivel del mar (UNEP, 2002).

La temperatura promedio en 4 de las 6 poblaciones fue muy similar, estas poblaciones son Quebrada Cruz Loma (T), Pasochoa (P), Lloa (L) y Antisanillo (A). Las dos temperaturas promedio que difieren son la de Peñas Blancas (C) y Monteserrín Bajo (M). Peñas Blancas tiene una temperatura promedio más baja que las demás mientras que Monteserrín Bajo una temperatura promedio más alta. Al observar la altura de cada población, es probable que esto se deba a que la población de Peñas Blancas se encontraba a una mayor altura sobre el nivel del mar que las demás mientras que Monteserrín Bajo fue la población que se encontraba a una menor altura sobre el nivel del mar. Como ya se explicó, la temperatura va descendiendo mientras mayor sea la altura (UNEP, 2002). Por

otro lado, la humedad relativa es más o menos constante en las poblaciones (Tabla 3). La humedad relativa indica el porcentaje de agua presente en una masa de aire en relación a la humedad absoluta que podría contener esta masa sin que exista condensación del agua. La cantidad de agua contenida en el ambiente es cercana al máximo absoluto en las localidades utilizadas. No existe correlación entre la temperatura y la humedad relativa. Esto se debe a que la humedad existente en un sitio determinado depende de un gran número de factores como la cantidad de agua presente, la geografía del mismo, los seres vivos presentes y no solamente de la temperatura.

6.2 ÉXITO DE LA TRANSFERENCIA DE LOS MARCADORES

La transferibilidad de los microsátélites de *D. mojavensis* a *D. mesophragmatica* fue baja (Tabla 4). La mayoría de los *primers* utilizados sí dieron lugar a una amplificación pero en la mayoría de casos la cantidad de bandas era demasiado numerosa, la visibilidad de las bandas era muy mala o el locus era monomórfico. El 70,8% de los *primers* amplificaron, esto difiere de lo encontrado en los estudios de Barbará *et al.* (2007) en donde se sugiere que un 61% de los marcadores polimórficos amplifican al ser transferidos de una especie a otra cuando se trabaja dentro de un mismo género en el caso de artrópodos. En los estudios hechos por Barbará *et al.* (2007), se toma en cuenta el porcentaje de marcadores que amplifican y que dan un resultado legible. En el caso de los marcadores que amplificaron en este estudio, la mayoría de ellos daban resultados ilegibles, con demasiadas bandas o con bandas leves. Algunos de los *primers* utilizados eran demasiado inespecíficos para la especie estudiada. Es por esta razón que su unión al ADN era poca específica y daba

como resultado la amplificación de varias regiones del ADN, resultando en una lectura con gran cantidad de bandas y haciendo imposible la identificación de los alelos deseados. Esto se trató de evitar elevando la temperatura, sin embargo en muy pocos casos se logró corregir esta falla.

De los 24 pares de *primers* ensayados, solamente 5 dieron una amplificación positiva con bandas claras para su lectura y presentaron polimorfismo. Esto quiere decir que se obtuvo una transferibilidad del 20,8%, lo cual difiere de lo encontrado por Barbará *et al.* (2007). Ellos observaron que un 62% de marcadores amplifican y presentan polimorfismo al transferir de una especie a otra dentro del mismo género en artrópodos. Sin embargo encuentran también que en especies tropicales, el porcentaje de transferencia de marcadores polimórficos es de 41% (aquí no se especifica el grupo ni rango taxonómico). De la misma manera en especies endémicas el porcentaje de transferencia es de 59% (aquí tampoco se especifica grupo ni rango taxonómico) (Barbará *et al.*, 2007). En *D. mesophragmatica* el porcentaje de marcadores polimórficos que amplifican es baja, probablemente se deba a que es una especie tanto tropical como endémica. Otra razón por la cual el porcentaje de amplificación podría ser bajo es porque según Barbará *et al.* (2007), las especies con ciclos de vida cortos tienen un éxito de amplificación más bajo y por lo tanto una tasa de mutación más elevada lo cual dificulta la transferibilidad de marcadores de una especie a otra.

La baja transferibilidad también se puede explicar porque la especie de la cual provienen los microsatélites, *D. mojavensis*, es una especie con un hábitat y una

distribución completamente distintos al de *D. mesophragmatica*. Esta diferencia de hábitat genera diferentes tasas de mutación, lo que a su vez baja la transferibilidad. Además, a pesar de que *D. mesophragmatica* y *D. mojavensis* son del mismo género, no son del mismo grupo. *D. mesophragmatica* pertenece al grupo *mesophragmatica* mientras que *D. mojavensis* pertenece al grupo *repleta*, los dos grupos provienen de la misma radiación (*repleta*) (Van der Linde y Houle, 2008). Se utilizó los *primers* de *D. mojavensis* porque no existían publicaciones de estudios con *primers* de las especies del grupo *mesophragmatica*. *D. mojavensis* es una de las 12 especies de *Drosophila* de las cuales se tiene el genoma completo secuenciado y existe un gran número de marcadores microsatélites específicos para esta especie.

Las condiciones que se utilizaron tanto para la PCR como para la corrida de las muestras de cada marcador son diferentes a las condiciones utilizadas en los estudios cuyo objetivo fue sintetizar estos marcadores (Tabla 5). Esto se debe a que no había amplificación en *D. mesophragmatica* al usar las condiciones mencionadas en los artículos. La condición más importante fue la temperatura y la cantidad de ciclos de la PCR. En ningún caso se realizó la PCR touchdown con 36 ciclos (3:3:30) o la temperatura de anillamiento de 56°C que proponía los artículos de Etges *et al.* (2007) y Staten *et al.* (2004).

6.3 NÚMERO DE MARCADORES UTILIZADOS

El número de marcadores utilizados (cinco) fue el adecuado para los análisis de diversidad genética de las poblaciones, los de variancia genética y estructura poblacional. La diversidad genética promedio de las poblaciones es extremadamente alta cuando se toma en cuenta solo uno de los marcadores, sin embargo al tomar en cuenta 4 de ellos o los 5 se llega a un valor estable, lo cual nos indica que aunque se usaran más marcadores, la diversidad genética tendría un valor equivalente a la que se obtiene con 5 marcadores (Figura 2 y 3). Lo mismo sucede con la variancia genética, es decir mientras más marcadores se toman en cuenta, ésta se va estabilizando hasta que a los 4 y 5 marcadores el valor obtenido es prácticamente el mismo. Esto también nos indica que al utilizar más marcadores se obtendría el mismo valor, por lo tanto no fue necesaria la búsqueda marcadores adicionales (Figura 4 y 5). Los resultados obtenidos pueden indicar con bastante claridad la diversidad que tiene cada población, la variancia genética que hay entre ellas y además darnos una idea acerca de la estructura poblacional.

6.4 ANÁLISIS INTRAPOBLACIONALES

6.4.1 DIVERSIDAD GÉNÉTICA EXISTENTE EN LAS POBLACIONES

La mayoría de los locus estudiados muestran una gran cantidad de alelos (Tabla 6 y Figura 6) y no hay una población que demuestre una cantidad superior o inferior significativa que el resto en cuanto al número de alelos por locus. La cantidad de alelos

únicos es elevada, lo cual también indica que la variabilidad es elevada (Tabla 7). Existe una cierta diferencia en cuanto a la cantidad de alelos únicos por población, siendo Quebrada Cruz Loma (T) la que más alelos únicos tiene mientras que Pasochoa (P) no tiene ninguno. En el caso de Pasochoa (P), probablemente la cantidad de individuos ($n=9$) muestreados para esta población hizo que no se encuentre alelos únicos en esta población. Lo más probable es que si se hubiera logrado conseguir los 20 individuos como en las demás poblaciones, sí se tendría alelos únicos. En cuanto a Quebrada Cruz Loma (T), igualmente la cantidad de alelos únicos que tiene puede deberse al azar y no ser significativa. La otra opción sería que es una población más aislada que las demás y que tiene menos interacción con las otras, sin embargo esta teoría no es consistente con los análisis realizados.

En cuanto a los índices de variabilidad genética, nos indican valores relativamente uniformes, es decir no existe una población que tenga una mayor o menor variabilidad. Además los valores indican que las poblaciones sí tienen variabilidad genética, lo cual es de extrema importancia en las poblaciones de una especie ya que esto lleva a una mayor posibilidad de adaptación en caso de que existan presiones selectivas (Beebee y Rowe, 2008). En la única población en donde se observa una ligera diferencia que el resto es en la población de Pasochoa (P). Esta población tiene una diversidad genética promedio más elevada que el resto de poblaciones, la cual podría estar influenciada por un número menor de individuos ($n=9$) con un número de alelos similar a aquellas poblaciones con ($n=20$). Es por esta razón que la heterocigosidad observada es similar al de las otras poblaciones mientras que la esperada es más elevada. Sin embargo, resultó positivo en cuanto a que los

individuos fueron bastante variables y dieron lugar a una diversidad alélica igual de abundante que las poblaciones con 20 individuos. Se espera por lo tanto que con 20 individuos de esta población, la heterocigosidad esperada sea menos elevada y se obtenga una cifra parecida a la de las demás poblaciones (Tabla 8).

6.4.2 EQUILIBRIO H-W

Los resultados de los análisis indican que por lo menos dos loci de cada población no están en HWE. Es común obtener uno o algunos loci que no cumplen con HWE, otros estudios de estructura poblacional que han encontrado lo mismo son Schiffer *et al.*, 2007; Capy *et al.*, 2000; Cobb *et al.*, 2000; Frydenberg *et al.*, 2002; Pascual *et al.*, 2001 y Schiffer *et al.*, 2007. Una causa para la desviación podría ser el efecto Walhund, es decir que dos poblaciones se confundan con una (Freeland, 2005). Cuando existe el efecto Walhund lo que sucede es que las subpoblaciones (2 o más) tienen diferentes frecuencias alélicas y por lo tanto la heterocigosidad se reduce. A pesar de que el muestreo se efectuó en un área reducida, la capacidad de dispersión de *D. mesophragmatica* es alta. Por lo tanto es difícil definir los límites de cada población y, como se verá más adelante, es probable que las poblaciones en estudio sean metapoblaciones. Adicionalmente, la desviación del HWE puede existir cuando las poblaciones no están en panmixia, es decir cuando no existe un apareo al azar. Hay evidencia de que las moscas no se aparean al azar, sino que prefieren individuos con características parecidas (van Heerwarden *et al.*, 2009). Esto nos indica que la ausencia de panmixia es una posible razón (Tabla 9).

Otras posibilidades que pueden explicar la desviación de HWE son que haya selección de un genotipo en particular, que exista deriva génica, que existe desequilibrio ligado, por efectos de mutación, endogamia o migración. La selección de un genotipo en particular usualmente no es el caso ya que los microsatélites son secciones repetitivas del ADN y no codifican para un producto, por lo tanto deberían ser neutros a la selección natural (Beebee y Rowe, 2008). La deriva génica es una posibilidad, ya que no se conoce el tamaño de las poblaciones. Si son pequeñas, la deriva génica puede estar actuando de tal manera que influya en las proporciones de homocigotos. El desequilibrio ligado, como se explica posteriormente, no es significativo en estas poblaciones y por lo tanto no es una explicación. La mutación puede ser otra fuerza que lleve a la desviación del HWE, ya que las tasas de mutación de los microsatélites son bastante altas (Freeland, 2005). La endogamia es otra explicación a la desviación del equilibrio ya que sí existe endogamia en las poblaciones. Por último, el flujo génico también puede estar influyendo ya que a pesar de que existe estructuración poblacional, potencialmente habría escenario de flujo génico a través de migración.

La desviación del HWE en muchos casos puede ser el resultado de un error de muestreo (Freeland, 2005). En este caso esto puede ser que haya un error de muestreo, ya que a pesar de que el número de individuos total es alto, el número de individuos de cada población es de solamente 20 (y en un caso 9). La dificultad en la obtención de los individuos y la cantidad de poblaciones (que implicaba un número total de individuos alto) obstaculizó la posibilidad de utilizar más individuos por población. Sin embargo, la falta de muestreo no es necesariamente el único factor que dio lugar a este resultado. El HWE se

alcanza al cumplirse ciertas condiciones, y en la naturaleza en varios casos no se la puede obtener.

6.4.3 EQUILIBRIO LIGADO

Como se mencionó en el párrafo anterior, los loci en estudios están en equilibrio ligado. Esto quiere decir que la segregación de cada uno de ellos es independiente de los demás. En este caso el número efectivo de loci es 5, y por lo tanto los 5 loci utilizados en el estudio sirven para los análisis genéticos (Freeland, 2005). Los tres pares de loci que se encontraron en desequilibrio ligado solamente lo estaban para una de las seis poblaciones, por lo tanto no se los tomó en cuenta como loci en desequilibrio ligado (Tabla 10 y Anexo 12).

Los estudios intrapoblacionales indican que son poblaciones saludables, es decir bastante variables, lo cual es muy importante para poblaciones de una especie endémica como es *D. mesophragmatica*. El ambiente está en constante cambio y es necesario que las poblaciones evolucionen continuamente y se adaptan a diferentes presiones selectivas. Además una variación genética baja da lugar a endogamia, lo cual reduce el fitness de los individuos (Freeland, 2005).

6.5 ANÁLISIS INTERPOBLACIONALES

6.5.1 ENDOGAMIA

Los análisis de endogamia indican que en las poblaciones de Antisanillo (A), Quebrada Cruz Loma (T) y Pasochoa (P) la heterocigosidad es más baja de lo esperado, lo cual indica que sí existe endogamia (Tabla 11). El tamaño de la población tiene bastante influencia sobre la endogamia. Una de las explicaciones sería por lo tanto que el tamaño de estas poblaciones es menor al de las otras tres poblaciones, Lloa (L), Monteserrín bajo (M) y Peñas Blancas (C). Éstas no muestran señales de endogamia (Tabla 11). Sin embargo el F_{IT} en todas las poblaciones se acerca más a 0 que a 1, y al medir la endogamia de cada individuo respecto al total de poblaciones el resultado nos indica que la endogamia no es significativa en las poblaciones, está presente pero no está afectando la variabilidad.

6.5.2 DIVERGENCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES

El estadístico F_{ST} mide la diferenciación genética entre poblaciones al medir el grado de endogamia dentro de una población relativo al total de todas las poblaciones (Freeland, 2005). En este estudio se obtuvo una diferenciación genética leve en cuatro de las comparaciones y una diferenciación genética moderada en el resto. Las permutaciones nos indican que a pesar de que los F_{ST} sean bajos, la diferenciación genética es significativa en todas las comparaciones con la excepción de Pasochoa (P)-Peñas Blancas (C) (Tabla 12). Esto sugiere que a pesar de que las poblaciones no tienen valores altos de

diferenciación genética, los valores obtenidos del F_{ST} no son producidos por el azar y que sí existe una cierta estructuración poblacional. La razón por la cual el valor F_{ST} no es significativo cuando se compara a las poblaciones Pasochoa y Peñas Blancas puede ser por varias razones. Una de ellas es que a pesar de que la distancia entre las dos poblaciones es grande, no se encuentran separadas por una cordillera. Probablemente la ubicación de cada población es fácilmente accesible para la otra y existe una gran cantidad de flujo génico entre las dos. Sin embargo este resultado también podría explicarse por el hecho de que en la población de Pasochoa el número de individuos recolectados fue menor. La falta de datos de esta población podría producir el aparente resultado de que es más parecida genéticamente a la población de Peñas Blancas de lo que en realidad es.

6.5.3 BARRERAS GEOGRÁFICAS Y HUMANAS

Como se mencionó en el párrafo anterior, la significancia de los datos obtenidos indica la existencia de una estructuración poblacional. La prueba de Mantel demuestra que no existe correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ($r = -0,017$). Esto significa que se puede afirmar que en estas poblaciones no se aplica el modelo de aislamiento por distancia, es decir que mientras más alejadas se encuentren las poblaciones, menos flujo génico habrá (Balloux y Moulin, 2002; Freeland, 2005). Este resultado no es sorprendente si se toma en cuenta las condiciones geológicas en las cuales se encuentran las poblaciones. Se escogió cuatro poblaciones en las dos cordilleras (al lado este y oeste de cada una) y dos poblaciones en la zona interandina. Justamente por esto, a pesar de que dos poblaciones estén cercanas, su flujo génico no será necesariamente mayor a dos

poblaciones que estén más alejadas. Lo que se asume es que las cordilleras actúan como barrera e impiden la migración de la mayoría de individuos de un lado al otro de la misma. *D. mesophragmatica* se encuentra por lo general a una altura de 2700 a 3600 msnm (Céspedes, 2010). Las cordilleras andinas superan esta altura, por lo tanto son inaccesibles para los individuos de las poblaciones e impiden que crucen de un lado al otro de la cordillera. Es importante saber que en las dos cordilleras hay montañas que no alcanzarán una altura tan extraordinaria como otras, estos espacios permitirían entonces el paso de los individuos. Sin embargo el flujo probablemente es mucho menor de lo esperado de si se tratara de un territorio plano.

La montaña en sí actuaría como barrera física, pero la diferencia de hábitat actúa como barrera ecológica. Un estudio que apoya esta idea es aquel de Iliadi *et al.* (2001). Esta publicación afirma que existe una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones de *D. melanogaster* que viven en diferentes pendientes de un sistema montañoso. Esto se puede explicar por la diferente cantidad de radiación solar, humedad y temperatura que crean hábitats diferentes. Además, por estos mismos factores la vegetación y por lo tanto fuente alimenticia de las moscas va a ser muy diferente en dos pendientes a distintos lados de un sistema montañoso. La adaptación local a pendientes con diferentes hábitats aumenta la divergencia genética entre poblaciones.

Se realizó un análisis de coordenadas principales con los datos del F_{ST} . El alto porcentaje de variación explicado por los ejes (80,85%) nos indica que las distancias genéticas (F_{ST}) entre las poblaciones están reflejadas con claridad en el gráfico (Figura 7).

Los resultados obtenidos nos indican que existe un mayor flujo génico entre las poblaciones Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín Bajo (M) y entre las poblaciones Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C) mientras que las poblaciones de Lloa (L) y Antisanillo (A) tienen un flujo génico bajo con todas las poblaciones y entre ellas.

En cuanto a Quebrada Cruz Loma (T), Lloa (L) y Monteserrín Bajo (M) (que son las tres poblaciones situadas hacia el norte del área muestreada), la ubicación geográfica de cada población probablemente explica el por qué de estas distancias genéticas. La población Quebrada Cruz Loma (T) se encuentra ubicada en la cordillera occidental hacia el lado de la zona interandina mientras que la de Lloa (L) está también en la cordillera occidental pero hacia la costa. La población Monteserrín Bajo (M) se encuentra en la zona interandina. A pesar de que Quebrada Cruz Loma (T) se encuentra mucho más cercana a Lloa (L) (está a tan sólo 8,35 km de distancia) (Tabla 13 y Figura 7) que de Monteserrín Bajo (M), existe una cordillera (la occidental) entre Lloa (L) y las otras dos poblaciones, evitando así una migración muy fuerte a través de esta barrera. Por otro lado, no existe esta barrera geográfica entre Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín bajo (M), entonces a pesar de su distancia geográfica (31,63 km), la migración es más factible entre las dos. Algo parecido sucede con las otras tres poblaciones. Antisanillo (A) se encuentra más cercana a Peñas Blancas (C) (a 14,37 km) que Pasochoa y Peñas Blancas (C) entre sí (separadas por 33,25 km). Sin embargo, Antisanillo (A) se encuentra en la cordillera oriental hacia el Oriente, mientras que Peñas Blancas (C) se encuentra en la cordillera oriental hacia la zona interandina y Pasochoa (P) se encuentra en la zona interandina. El flujo génico entre

Antisanillo (A) y las otras dos poblaciones cercanas se ve obstaculizado por la cordillera (oriental) que les separan.

Las ubicaciones de Antisanillo (A) y Lloa (L) en el PCoA son lejanas a las demás poblaciones y entre sí ya que se encuentran bloqueadas de las otras poblaciones por las dos cordilleras, Lloa (L) por la cordillera occidental y Antisanillo (A) por la cordillera oriental. Es por lo tanto comprensible que su distancia genética les ubique alejadas, probablemente existe menos flujo génico con las otras poblaciones por el mismo hecho de que existe esta barrera.

Un fenómeno que no se puede explicar por la barrera que constituyen las dos cordilleras es la cantidad poco significativa de flujo génico entre Monteserrín Bajo (M) con Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C) así como entre Quebrada Cruz Loma (T) con Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C). La primera explicación que viene a la mente sería que la distancia es mayor entre dichas poblaciones. Sin embargo, como se puede ver en la Tabla 16, este no es el caso. Las distancias entre las cuatro poblaciones son más o menos equivalentes con la excepción de Monteserrín Bajo (M) y Pasochoa (P) que se encuentran un poco más alejadas (a 48,47 km). Las distancias son incluso a veces menores entre las poblaciones con menor flujo génico. La ausencia de una mayor cantidad de flujo génico no se puede explicar ni por la distancia geográfica ni por la barrera física de las cordilleras. Una explicación podría ser que cada pareja de poblaciones cuyo flujo génico es alto tienen ciertas rutas migratorias que no tienen con las otras poblaciones. El hecho de que Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín Bajo (M) estén más hacia el norte y Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C) más

hacia el sur posiblemente facilita la migración de los individuos entre estas poblaciones. Otra explicación posible es la fragmentación por asentamientos humanos, es decir que las rutas entre las poblaciones hacia el sur y hacia el norte están interrumpidas por pueblos y la ciudad de Quito, sus alrededores y las zonas agrícolas (Marquet, 2002). Estos diferentes tipos de asentamientos humanos (tanto ciudades como áreas cultivadas) fragmentan los hábitats de las moscas al derrumbar los bosques en donde viven. Las poblaciones se ven obligadas a encontrar refugios en otros bosques o en quebradas. Su hábitat se reduce y sus rutas migratorias son interrumpidas.

En el caso de que los asentamientos humanos y zonas agrícolas expliquen la falta de flujo génico entre las poblaciones del norte y las del sur de la zona interandina, habría que explicar por qué éstos están actuando como barrera para el flujo entre estas poblaciones y no para el flujo entre Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín bajo (M). Como se observa en la Figura 1, entre estas dos poblaciones está la ciudad de Quito. Ésta constituye una barrera enorme para la dispersión de los individuos. ¿Por qué entonces en este caso sí existe un gran flujo génico? Para ir desde la Quebrada Cruz Loma (T) hasta Monteserrín bajo (M) y vice versa, los individuos han encontrado una ruta de dispersión. Es muy difícil saber los caminos exactos tomados por las moscas pero es probable que existan rutas de flujo génico alrededor de la ciudad que permiten la dispersión de los individuos de una población a otra, posiblemente a través de bosques o bien zonas poco habitadas. Otra explicación podría ser el cambio en la geografía de Quito a lo largo del tiempo. Al ser una ciudad construida en las faldas de un monte, su crecimiento ha sido bastante irregular a través de los tiempos. En tan solo 50 años, la población de Quito urbano y rural es cinco veces lo que era (Murray, en

línea, 1998). Existe por lo tanto la posibilidad de que la dispersión se haya dado antes de que la ciudad de Quito crezca hacia el norte. Las rutas migratorias que existían pueden haber facilitado una dispersión alta de individuos de las dos poblaciones entre sí. Esas rutas pueden haber desaparecido ahora, pero la interacción entre individuos reciente hace que sean más parecidas genéticamente. De la misma manera el clima de Quito y sus alrededores hace algunas décadas era más frío lo cual igualmente pudo haber facilitado la migración de individuos (Murray, en línea, 1998). Por último, las zonas adyacentes a la ciudad no estaban tan fragmentadas como actualmente se encuentran, antaño existían menos áreas de cultivo. Las zonas no intervenidas también pueden haber actuado como rutas para el intercambio de individuos. Lo que está claro es que existen o existían rutas de dispersión entre Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín bajo (M) que no son factibles entre Quebrada Cruz Loma (T) y Monteserrín bajo (M) con Pasochoa (P) y Peñas Blancas (C).

6.5.4 FLUJO GÉNICO EXISTENTE ENTRE LAS DIFERENTES POBLACIONES

A pesar de que se habla de este flujo génico reducido entre algunas poblaciones, solamente se puede decir que es un flujo génico reducido en comparación con el que existe entre otras poblaciones de este mismo estudio. Los valores de los F_{ST} , como ya se ha mencionado, son de todas maneras bajos y la divergencia genética es asimismo baja. Esto revela que a pesar de todas las barreras y asentamientos humanos sí existe flujo génico entre todas las poblaciones, pero en diferente magnitud.

Para complementar los análisis se realizó un AMOVA, el cual demostró que la mayor parte de la variancia (94,26%) se encuentra dentro de las poblaciones, es decir entre los individuos de una población (Tabla 15). Este resultado apoya los análisis anteriores, tanto los intrapoblaciones como los interpoblacionales. Ya se mencionó que la cantidad de alelos, la heterocigosidad esperada, el rango alélico son bastante fuertes, es decir que existe una diversidad genética considerable en cada población. El AMOVA también está indicando esto ya que el 94,26% de la variancia es intrapoblacional. Además, los análisis interpoblaciones F_{ST} muestran una divergencia muy ligera entre poblaciones. El AMOVA igualmente está confirmando estos resultados ya que solamente el 5,64% de la variancia es interpoblacional.

Los resultados obtenidos nos estarían indicando es que existe poca divergencia genética (ya que los F_{ST} son bastante bajos), pero aún así existe una cierta estructuración poblacional (porque la significancia de los F_{ST} es alta). Es muy probable que las poblaciones en estudio se traten de una metapoblación. Una metapoblación es un conjunto de poblaciones que interactúan por la dispersión de individuos a través de ellas. Muchas especies existen así porque el paisaje en el que se encuentran es desigual, sea esto por pérdida de hábitat, fragmentación, entre otros. Estos paisajes desiguales representan una de las situaciones donde las teorías y modelos de metapoblaciones son particularmente adecuadas (Marquet, 2002). En este caso, es claro que el paisaje donde habita la especie es desigual, no solamente porque se encuentra en y entre dos cordilleras y su hábitat de preferencia es a un cierto rango de altura, sino porque también entre las diferentes

poblaciones existen asentamientos humanos, el más importante siendo la ciudad de Quito y sus extensos alrededores los cuales incluyen áreas agrícolas.

La metapoblación de *D. mesophragmatica* tiene un flujo génico importante entre sus poblaciones. Se ha visto que el flujo génico es alto en animales que pueden volar como es el caso de *D. mesophragmatica*. Las diferentes especies del género *Drosophila* se mueven en caminos relativamente rectos (dentro de lo posible) a velocidades moderadas hasta encontrar alimento. Después de haberse alimentado, se mueven poco (Begon *et al.*, 1990). Es difícil estimar la tasa a la cual se mueven los individuos de este género por ser especies que tienen un ciclo de vida bastante corto, además existe una variación enorme en cuanto a la dispersión de *Drosophila* según la especie y sus respectivos hábitos alimenticios. Algunas especies se mueven tan solo unos pocos metros al día mientras que otras pueden moverse kilómetros en un día (Dobzhansky y Wright, 1943; Simon, 2010).

El intercambio de genes provocado por la dispersión entre poblaciones homogeniza las frecuencias alélicas de las distintas poblaciones y hace que los efectos de selección y deriva génica sean bajos. Además, impide en un cierto grado la adaptación local y por lo tanto la especiación (Bridle *et al.*, 2009). Por otro lado, el flujo génico también genera nuevos polimorfismos en las poblaciones (Balloux y Moulin, 2002). Este fenómeno tiene beneficios para la especie y su presencia en la especie estudiada nos provee más evidencia de su buena salud genética.

Las poblaciones de *D. mesophragmatica* estudiadas están al parecer bastante saludables genéticamente al tener una gran variación genética y de la misma manera un flujo génico importante que permite mantener esta variación. Al parecer las dos cordilleras y posiblemente los asentamientos humanos están actuando como barreras e impidiendo en un cierto grado el flujo de genes de una población a otra. Por el momento esto no parece haber afectado las poblaciones ya que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de las poblaciones, sin embargo en el futuro podría llevar a la adaptación local de cada población a su medio.

7. CONCLUSIONES

La transferibilidad de los marcadores de *D. mojavensis* a *D. mesophragmatica* fue muy baja. El hecho de que *D. mesophragmatica* sea una especie endémica, tropical y que tenga un ciclo de vida corto seguramente bajó la transferibilidad de los marcadores. Además, el parentesco entre las dos especies no es lo suficientemente fuerte como para que la transferencia sea bastante exitosa. El haber logrado transferir cinco microsatélites y poder usarlos para futuros estudios de especies del grupo *mesophragmatica* es de gran importancia. Sin embargo el esfuerzo y tiempo necesarios para la transferencia supera el beneficio, el desarrollo de *primers* específicos para el grupo sería posiblemente una mejor idea.

Los estudios de diversidad genética muestran poblaciones con bastante variabilidad y por lo tanto saludables genéticamente. Este es un resultado positivo ya que las poblaciones de una especie necesitan variabilidad para adaptarse constantemente a presiones selectivas.

La diferenciación genética entre las poblaciones es baja, es decir las poblaciones son bastante parecidas. La mayor parte de la variación se da entre los individuos de las poblaciones más no entre poblaciones. Esto nos indica que el flujo génico es importante entre todas las poblaciones. Este flujo es lo que permite que se mantenga la variabilidad genética en cada población, pero a su vez impide en cierto grado la adaptación local al medio.

No existe correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica. Lo que parece estar sucediendo es que los Andes están actuando como barrera de un flujo génico elevado para las poblaciones que se encuentran tanto hacia la Costa (Lloa) como hacia el Oriente (Antisanillo). Por otro lado, la ciudad de Quito y sus alrededores así como otros asentamientos humanos también podrían estar actuando como barreras de un flujo génico elevado entre ciertas poblaciones.

Lo que estaría sucediendo con estas poblaciones de *D. mesophragmatica* es una cierta adaptación local de cada población a su medio, pero aún existe flujo génico entre ellas. Se tratarían de metapoblaciones. El hecho de que el flujo entre algunas poblaciones es menor probablemente se debe a la fragmentación existente. Por el momento esto no parece estar afectando el fitness de las poblaciones, sin embargo en el futuro podría ser causa de inquietud. Los asentamientos humanos como ciudades y zonas agrícolas interrumpen las rutas migratorias entre poblaciones y reducen su hábitat. La fragmentación es cada vez mayor, y combinado con el calentamiento global podría volverse un grave problema para las poblaciones de *D. mesophragmatica*.

La dinámica genética de estas poblaciones es bastante complicada y ésta podría verse afectada por las barreras naturales y por barreras humanas. Estudios posteriores sobre esta especie y otras especies del grupo serían interesantes para entender cómo se podría evitar dañar esta dinámica tan frágil.

8. LITERATURA CITADA

- Agis, M., Schlötterer, C. 2001. Microsatellite variation in natural *Drosophila melanogaster* populations from New South Wales (Australia) and Tasmania. *Molecular Ecology* 10: 1197 – 1205.
- Álvarez, D. 2002. Estructura genética poblacional en *Drosophila pseudoobscura* utilizando marcadores moleculares. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Arcos, O.G. 1989. Microdistribución de las especies del grupo *Drosophila repleta* (Diptera, Drosophilidae) en un cuadrante de Guayllabamba, Ecuador, con la descripción y biología de una nueva especie. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Avise, J.C. 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*, Sinauer Associates Inc., MA., E.E.U.U.
- Balloux, F., Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155 – 165.
- Barbará, T., Palma-Silva, C., Paggie, G.C., Bered, F., Fay, M.F., Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* 16: 3759 – 3767.

- Begon, M., Harper, J.L., Townsend, C.R. 1990. Ecology: Individuals, Populations and Communities, Blackwell Scientific Publications, Oxford, Inglaterra.
- Beebe, T., Rowe, G. 2008. Molecular Ecology: Segunda Edición, Oxford University Press, New York, E.E.U.U.
- Bridle, J.R., Gavaz, S., Kennington, W.J. 2009. Testing limits to adaptation along altitudinal gradients in rainforest *Drosophila*. Proceedings of the Royal Society 276: 1507 – 1515.
- Brcic, D. 1957. A comparative study of chromosomal variation in species of the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. Genetics 42: 789 – 805.
- Brcic, D., Koref-Santibañez, S. 1957. The *mesophragmatica* species group of *Drosophila*. Evolution 11: 300 – 310.
- Capy, P., Veuille, M., Paillette, M. 2000. Sexual isolation of genetically differentiated sympatric populations of *Drosophila melanogaster* in Brazzaville, Congo: the first step towards speciation? Heredity 84: 468 – 475.

- Céspedes, D. 2010. Análisis de la diversidad del género *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) en función de un gradiente altitudinal en la quebrada de Cruz Loma, Pichincha, Ecuador. Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Cobb, M., Huet, M., Lachaise, D., Veuille, M. 2000. Fragmented forests, evolving flies: molecular variation in African populations of *Drosophila teissieri*. *Molecular Ecology* 9: 1591 – 1597.
- Dieringer, D., Nolte, V., Schlötterer, C. 2005. Population structure in African *Drosophila melanogaster* revealed by microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 14: 563 – 573.
- Dobzhansky T.H., Wright, S. 1943. Genetics of natural populations. X. Dispersion rates in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 28: 304 – 340.
- Duda, O. 1927. Die Sudamerikanischen Drosophiliden unter Berücksichtigung auch der anderen Neotropischen sowie Nearktischen Arten. *Archiv Naturgesch* 91(A)11/12: 1 – 229.
- Etges, W.J., Cardoso de Oliveira, C., Gragg, E., Ortíz-Barrientos, D., Noor, M.A.F., Ritchie, M.G. 2007. Genetics of incipient speciation of *Drosophila mojavensis*. I.

Male courtship song, mating success and genotype x environment interactions. *Evolution* 61: 1106 – 1119.

Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics Society of America* 131: 479 – 491.

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

Freeland, J.R. 2005. *Molecular Ecology*, John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, Inglaterra

Frydenberg, J., Pertoldi, C. Dahlgaard, J., Loeschke, V. 2002. Genetic variation in original and colonizing *Drosophila buzzatii* populations analysed by microsatellite loci isolated with a new PCR screening method. *Molecular Ecology* 11 : 181 – 190.

Germanos, E., Mota, N.R., Loreto, E.L.S. 2006. Transposable elements from the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. *Genetics and Molecular Biology* 29: 741 – 746.

- Hamblin, M.T., Veuille, M. 1999. Population Structure Among African and Derived Populations of *Drosophila simulans*: Evidence for Ancient Subdivision and Recent Admixture. *Genetics* 153: 305 – 317.
- Hartl, D.L., Clark, A.G. 2007. Principles of Population Genetics: Cuarta Edición, Sinauer Associates, Inc., MA, E.E.U.U.
- Hunter, A.S., Hunter, R.A. 1964. The *mesophragmatica* species group of *Drosophila* in Colombia. *Annals of the Entomological Society of America* 57: 732 – 736.
- Iliadi, K., Iliadi, N., Rashkovetsky, E., Minkov, I., Nevo, E., Korol, A. 2001. Sexual and reproductive behaviour of *Drosophila melanogaster* from a microclimatically differentiated population of 'Evolution Canyon' interslope (Mount Carmel, Israel). *Proceedings of the Royal Society* 268: 2365 – 2374.
- Jaeger, C.P., Salzano, F.M. 1953. *Drosophila gaucha*, a new species from Brazil. *Revista Brasileira de Biología* 13: 205 – 208.
- Koref-Santibañez, S., Casanova, A., Brncic, D. 1958. Experiments on sexual isolation in species of the *mesophragmatica* group of *Drosophila*. *Proceedings of the Royal Entomological Society of London* 33 (10-12): 179 – 185.

Koref Santibañez, S. 1963. Courtship and sexual isolation in five species of the *mesophragmatica* group of the genus *Drosophila*. *Evolution* 17: 99 – 106.

Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics*, Blackwell Science Ltd, MA, E.E.U.U.

Marquet, P.A. 2002. “Metapopulations” en *Encyclopedia of Global Environmental Change* Volume 2, The Earth system: biological and ecological dimensions of global environmental change, John Wiley & Sons, Ltd, E.E.U.U.

Markow, T.A., O’Grady, P. 2008. Reproductive ecology of *Drosophila*. *Functional Ecology* 22: 747 – 759.

Mota, N.R., Robe, L.J., Valente, V.L.S., Budnik, M., Loreto, E. 2008 Phylogeny of the *Drosophila mesophragmatica* Group (Diptera, Drosophilidae): An Example of Andean Evolution. *Zoological Science* 25: 526 – 532.

Murray, S. 1998. “Silvicultura Urbana y Periurbana en Quito, Ecuador: Estudio de Caso” [en línea]. FAO. < <http://www.fao.org/docrep/w7445s/w7445s03.htm> > [Consulta: 17 oct. 2010]

Nacur, J. 1958. Genitalia masculina de *Drosophila* do grupo *mesophragmatica* (Diptera). *Revista Brasileira de Biología* 18: 243 – 249.

- Pascual, M., Aquadro, C.F., Soto, V., Serra, L. 2001. Microsatellite variation in colonizing and paleartic populations of *Drosophila subobscura*. *Molecular Biology and Evolution* 18: 731 – 740.
- Peakall, R., Smouse, P.E. 2006. GenAlEx 6 genetic analysis Excel. *Molecular Ecology Notes* 6: 288 – 295.
- Powell, J.R. 1997. *Progress and Prospects in Evolutionary Biology*, Oxford University Press, New York, E.E.U.U.
- Prat, D., Faivre Rampant, P., Prado, E. 2006. Analyse du genome et gestion des ressources génétiques forestières, Cemagref, Cirad, Infremer, INRA, París, Francia.
- Rafael, V., Vela, D. 2003. *Drosophila yangana* sp.nov. un nuevo miembro del grupo *repleta*, subgrupo *inca* (Diptera, Drosophilidae). *Revista Pontificia Universidad Católica del Ecuador* 71: 129 – 139.
- Ross, C.L., Dyer, K.A., Erez, T., Miller, S.J., Jaenike, J., Markow, T.A. 2003. Rapid divergence of microsatellite abundance among species of *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution* 20: 1143 – 1157.

Ross, C.L., Markow, T.A. 2006. Microsatellite variation among diverging populations of *Drosophila mojavensis*. *European Society for Evolutionary Biology* 19: 1691 – 1700.

Schiffer, M., Kennington, W.J., Hoffmann, A.A., Blacket, M.J. 2007. Lack of genetic structure among ecologically adapted populations of an Australian rainforest *Drosophila* species as indicated by microsatellite markers and mitochondrial DNA sequences. *Molecular Ecology* 16: 1687 – 1700.

SequentiX. 2006. “Principal Coordinate Analysis” [En línea]. GelQuest Manual.
<http://www.sequentix.de/gelquest/help/principal_coordinates_analysis.htm>
[Consulta: 12 enero 2011]

Simon, J. 2010. Behavioral analysis of exploration and dispersal in *Drosophila*. Ph.D Dissertation, California Institute of Technology, Pasadena, E.E.U.U.

Staten, R., Dixon Schully, S., Noor, M.A.F. 2004. A microsatellite linkage map of *Drosophila mojavensis*. *BMC Genetics* 5: 12.

Throckmorton, L. H. 1975. The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila*. *Handbook of Genetics* 3: 421 – 469.

Tweedie S., Ashburner, M., Falls, K., Leyland, P., McQuilton, P., Marygold, S., Millburn, G., Osumi-Sutherland, D., Schroeder, A., Seal, R., Zhang, H. y The FlyBase Consortium. 2009. FlyBase: enhancing *Drosophila* gene ontology annotations. *Nucleic Acids Research* 37: D555-D559; doi:10.1093/nar/gkn788.

UNEP. 2002. "Mountain Watch" United Nations Environment Programme World Conservation Monitoring Centre. pp. 11 – 17.

Van der Linde, K., Houle, D. 2008. A supertree analysis and literature review of the genus *Drosophila* and closely related genera (Diptera, Drosophilidae). *Insect Systematics & Evolution* 63: 241 – 267.

Van Heerwaarden, B., Kellermann, V., Schiffer, M., Blacket, M., Sgro, C.M., Hoffmann, A.A. 2009. Testing evolutionary hypotheses about species borders: patterns of genetic variation towards the southern borders of two rainforest *Drosophila* and a related habitat generalist. *Proceedings of the Royal Society* 276: 1517 – 1526.

Vela, D. y Rafael, V. 2004. Three new andean species of *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) of the *mesophragmatica* group. *Iheringia. Série zoológica* 94: 295 – 299.

Waggoner, B. 2009. "Diptera" [En línea]. University of California.
<<http://www.ucmp.berkeley.edu/arthropoda/uniramia/diptera.html>> [Consulta: 29 sept. 2009]

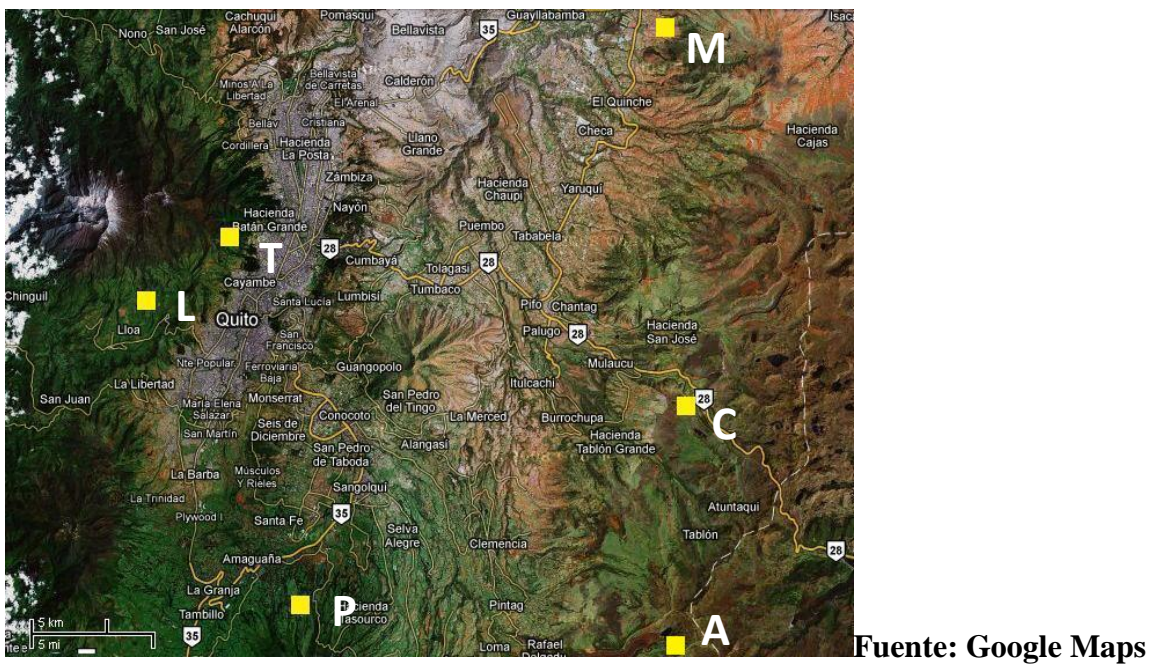
Watson, J., Caudy, A., Myers, R., Witkowski, J. 2007. Recombinant DNA: Tercera Edición, W.H. Freeman and Company, Nueva York, E.E.U.U.

Wiegmann, B., Yeates, D. 1996. "Diptera" [En línea]. North Carolina State University.
<http://www4.ncsu.edu/unity/lockers/ftp/bwiegman/fly_html/diptera.html>
[Consulta: 7 oct. 2009]

9. FIGURAS



A. Área de estudio (recuadro rojo)



B. Mapa topográfico. L = Lloa, T = Quebrada Cruz Loma, M = Monteserrín Bajo, P = Pasochoa, C = Peñas Blancas, A = Antisanillo.

Figura 1. Lugares de captura de *D. mesophragmatica* de la Provincia de Pichincha, Ecuador

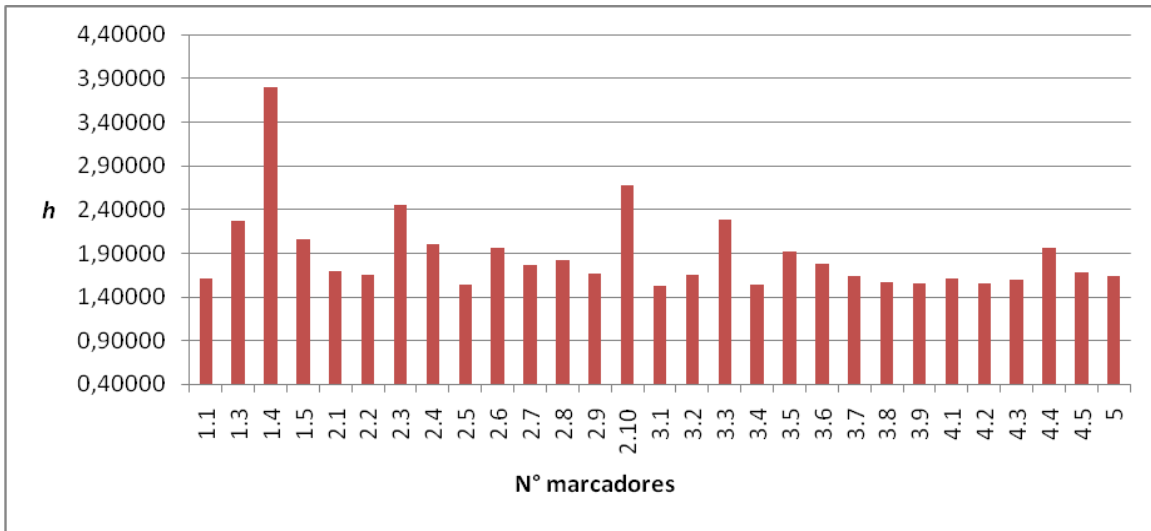


Figura 2. Valores de h según la combinación de marcador tomado en cuenta. Los números del eje x son la combinación de marcadores existente. El primer número indica cuántos marcadores se están tomando en cuando. El número después del punto indica el marcador o la combinación de marcador utilizado.

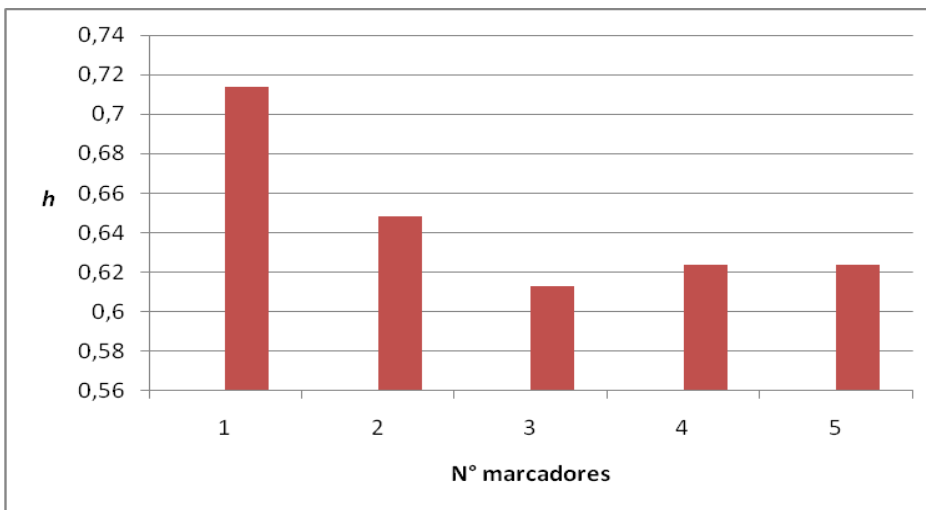


Figura 3. Valores de h promedio según el número de marcadores utilizados. Los números del eje x indican cuántos marcadores se utilizaron. En cada caso, se promedió el valor h obtenidos con un marcador, con dos marcadores, etc.

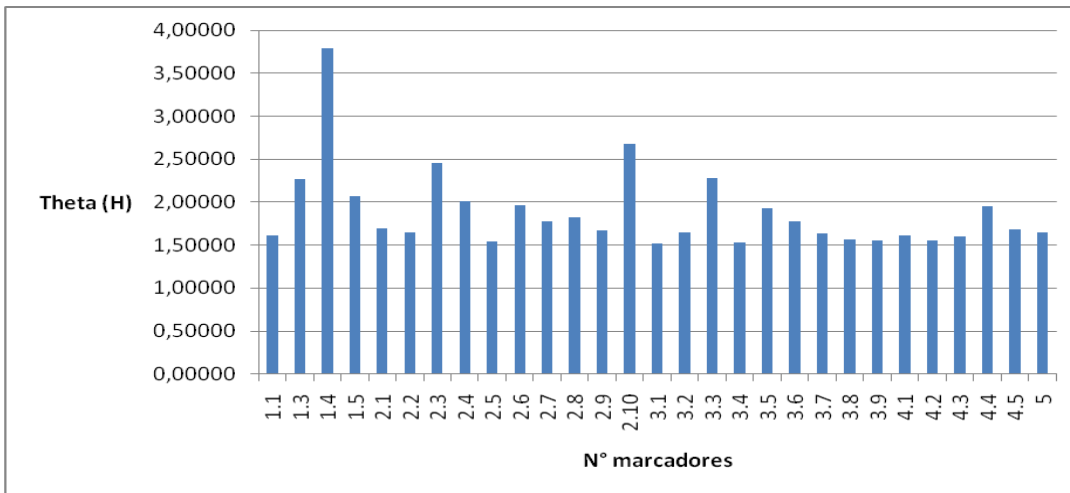


Figura 4. Valores de Theta (H) según la combinación de marcador tomado en cuenta.

Los números del eje x son la combinación de marcadores existente. El primer número indica cuántos marcadores se están tomando en cuando. El número después del punto indica el marcador o la combinación de marcador utilizado.

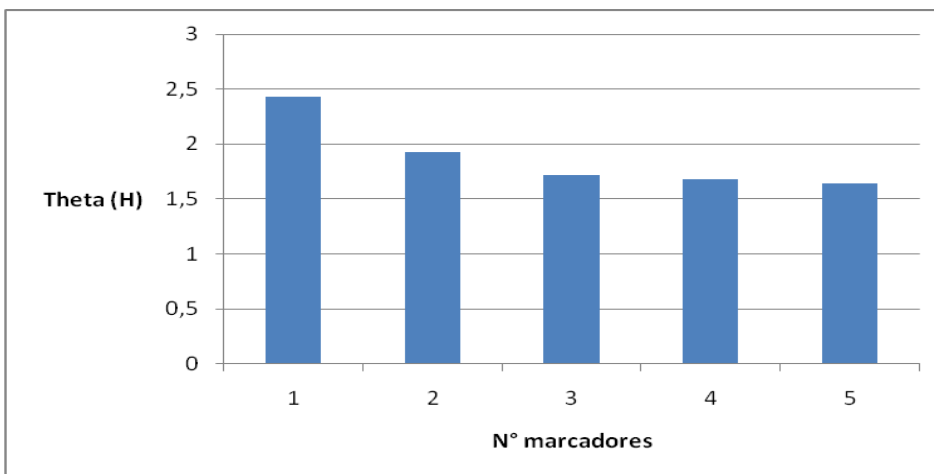


Figura 5. Valores de Theta (H) promedio según el número de marcadores utilizados.

Los números del eje x indican cuántos marcadores se utilizaron. En cada caso, se promedió el valor Theta (H) obtenidos con un marcador, con dos marcadores, etc.

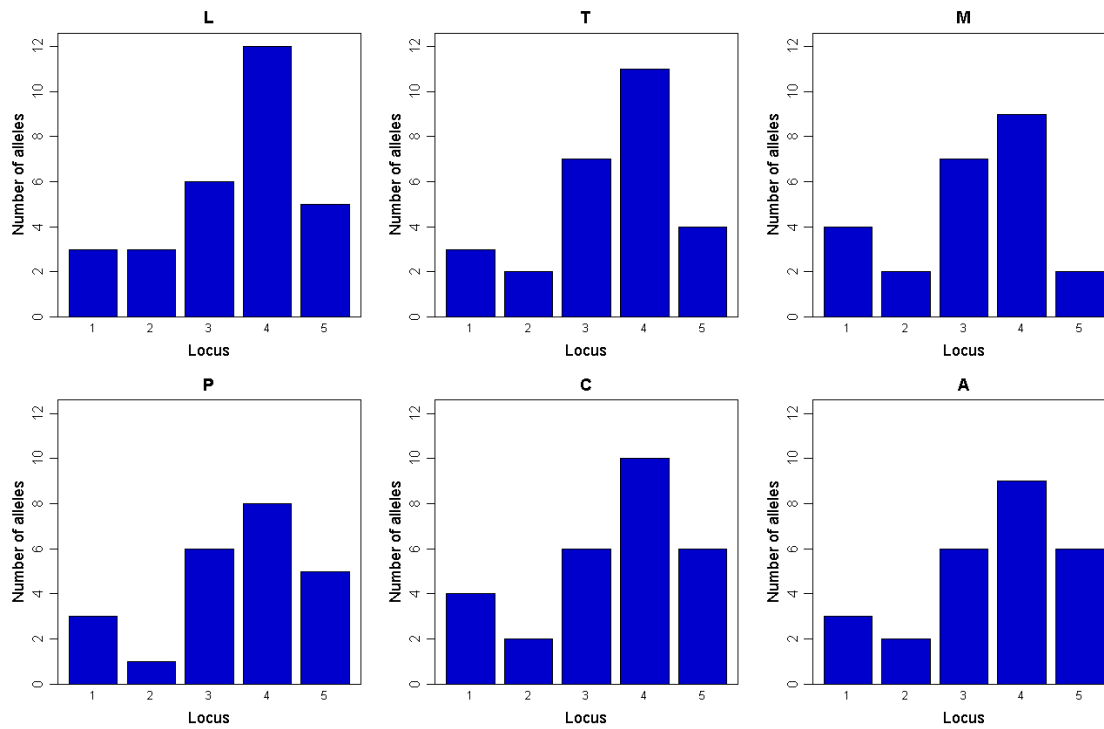
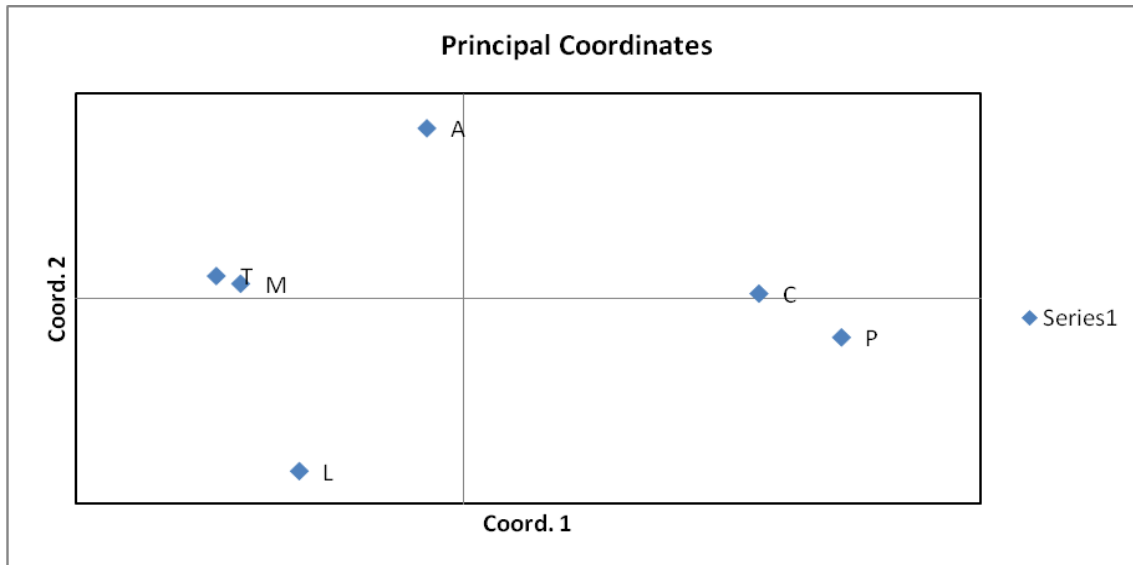


Figura 6. Número de alelos por locus en cada población (gráfico hecho por Arlequin)



Percentage of variation explained by the first 3 axes			
Axis	1	2	3
%	39,13	23,22	18,49
Cum %	39,13	62,35	80,85

Figura 7. PCoA vía matriz de covariancia sin estandarización de datos usando como matriz los F_{ST} entre parejas de poblaciones. L = Lloa, T = Quebrada Cruz Loma, M = Monteserrín Bajo, P = Pasochoa, C = Peñas Blancas, A = Antisanillo.

10. TABLAS

Tabla 1. N° de individuos de *D. mesophragmatica* capturados en las diferentes localidades

Localidad	Fecha colecta	N° machos recolectados	N° isolíneas sembradas	Total individuos incluidos investigación
Quebrada Cruz Loma (T)	09/07/09	0	0	20
	14/07/09	11	11	
	24/07/09	6	9	
Pasochoa (P)	24/08/09	0	8	9
	02/09/09	2	5	
Peñas Blancas (C)	16/09/09	11	7	20
	24/09/09	6	4	
	14/10/09	0	4	
Lloa(L)	16/11/09	15	6	20
	25/11/09	5	2	
Monteserrín bajo (M)	16/12/09	23	15	20
	06/01/10	0	0	
Antisanillo (A)	16/02/10	22	5	20

Tabla 2. Coordenadas y altura de las localidades muestreadas

Localidad	Latitud	Longitud	Altura (msnm)
Quebrada Cruz Loma (T)	S 00°11'18,8''	W 078°31'25''	3300
Pasochoa (P)	S 00°25'37,7''	W 078°30'49,3''	2892
Peñas Blancas (C)	S 00°17'56,1''	W 078°14'37,5''	3628
Lloa(L)	S 00°14'04,9''	W 078° 34' 58,3''	3138
Monteserrín bajo (M)	S 00°04'09,1''	W 078°15'57,0''	2719
Antisanillo (A)	S 00°25'28,80''	W 078°16'21,86''	3352

Tabla 3. Temperatura promedio y humedad relativa promedio de los sitios de recolección de *D. mesophragmatica*

	Temp, °C	RH, %	Altura
Quebrada Cruz Loma (T)	11,3	73,7	3 300
Pasochoa (P)	11,0	86,2	2 892
Peñas Blancas (C)	7,5	74,0	3 628
Lloa (L)	11,1	77,4	3 138
Monteserrín Bajo (M)	13,2	84,1	2 719
Antisanillo (A)	10,9	80,9	3 352

La temperatura y humedad relativa promedio desde el día después de la colocación de las trampas hasta el día de recolección.

Tabla 4. *Primers* probados para el presente estudio

N°	Locus	Amplificación	Bandas Claras	Polimorfismo
1	DMOJ2010	Sí	No	-
2	DMOJ2020	Sí	No	-
3	DMOJ2210	Sí	Demasiadas	-
4	DMOJ2300	Sí	Demasiadas	-
5	DMOJ2302	Sí	Sí	Polimórfico
6	DMOJ3020	Sí	Sí	Polimórfico
7	DMOJ3030	Sí	Sí	Polimórfico
8	DMOJ3100	Sí	Demasiadas	-
9	DMOJ3101	Sí	Sí	Polimórfico
10	DMOJ4020	Sí	Demasiadas	-
11	DMOJ4030	Sí	No	-
12	DMOJ4050	No	-	-
13	DMOJ4301	Sí	No	-
14	DMOJ4300	No	-	-
15	DMOJ5010	No	-	-
16	DMOJ5020	Sí	Demasiadas	-
17	DMOJ5100	Sí	Demasiadas	-
18	DMOJ5200	Sí	Sí	Polimórfico
19	DMOJ5300	No	-	-
20	DMOJ5503	No	-	-
21	A2131	No	-	-
22	M2192	No	-	-
23	M3147	Sí	Demasiadas	-
24	M496	Sí	Sí	Monomórfico
PORCENTAJE		70,8		20,8

Tabla 5. Condiciones de amplificación y de corrida (geles de poliacrilamida) de los *primers* utilizados en el presente estudio

Locus	Condiciones PCR		Condiciones corrida en geles de poliacrilamida		
	Tipo de PCR	Ciclos y T°	[] ADN:Formamida	Muestra cargada	Corrida
3101	Touchdown	95° 1min. 5 ciclos 95° 30s, 60° 30s, 72° 30s 5 ciclos 95° 30s, 57° 30s, 72° 30s 20 ciclos 95° 30s, 54° 30s, 72° 30s 72° 2min.	1:0,5	2 µl	65W 2h00
3030	Touchdown	95° 1min. 5 ciclos 95° 30s, 59° 30s, 72° 30s 5 ciclos 95° 30s, 56° 30s, 72° 30s 20 ciclos 95° 30s, 53° 30s, 72° 30s 72° 2min.	1:1	2,5 µl	65W 1h40
5200	Touchdown	95° 1min. 5 ciclos 95° 30s, 64° 30s, 72° 30s 5 ciclos 95° 30s, 61° 30s, 72° 30s 20 ciclos 95° 30s, 58° 30s, 72° 30s 72° 2min.	1:0,5	2 µl	65W 2h00
2302	Touchdown	95° 1min. 5 ciclos 95° 30s, 61° 30s, 72° 30s 5 ciclos 95° 30s, 58° 30s, 72° 30s 20 ciclos 95° 30s, 55° 30s, 72° 30s 72° 2min.	1:0,5	2 µl	65W 2h00
3020	Touchdown	95° 1min. 5 ciclos 95° 30s, 59° 30s, 72° 30s 5 ciclos 95° 30s, 56° 30s, 72° 30s 20 ciclos 95° 30s, 53° 30s, 72° 30s 72° 2min.	1:0,5	2 µl	65W 1h40

Tabla 6. Número de alelos por locus en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica*

Locus	N° Alelos
3101	4
3030	3
5200	10
2302	15
3020	9
Promedio	8,2

Tabla 7. Alelos únicos en cinco poblaciones de *D. mesophragmatica*

Locus	Lloa (L)	Quebrada C. L. (T)	Monteserrín bajo (M)	Peñas blancas (C)	Antisanillo (A)
5200	144	170	164	152	---
2302	189	163, 191	---	---	---
3020	---	56	---	58	78

Se indica solamente las poblaciones y los locus para los cuales había alelos únicos

Tabla 8. Variabilidad genética en las diferentes poblaciones de *D. mesophragmatica*

Población	H _O promedio	H _E promedio	<i>d</i> promedio	Rango alélico promedio
Lloa (L)	0.584	0.632	5.800	17.600
Quebrada Cruz Loma (T)	0.531	0.631	5.400	17.600
Monteserrín bajo (M)	0.570	0.586	4.800	15.200
Pasochoa (P)	0.566	0.729	5.500	20.000
Peñas Blancas (C)	0.647	0.676	5.600	14.000
Antisanillo (A)	0.490	0.636	5.200	17.600

H_O= Heterocigosidad observada, H_E= Heterocigosidad esperada, *d*= diversidad alélica

Tabla 9. Equilibrio de Hardy-Weinberg según cada locus estudiado

Locus	N° poblaciones que cumplen HWE	N° poblaciones con desviación significativa	N° poblaciones con desviación altamente significativa
3101	2	3	1
3030	5	0	0
5200	1	1	4
2302	4	0	2
3020	2	2	2

Desviación significativa cuando $P < 0,05$; Desviación altamente significativa cuando $P < 0,01$

Tabla 10. Desequilibrio ligado significativo según par de loci analizados

Población	3020 – 3030	5200 – 3020	2302 – 5200
Lloa (L)	-	-	Significativo
Pasochoa (P)	-	Significativo	-
Peñas Blancas (C)	Significativo	-	-

Se incluyeron las poblaciones en las cuales se encontró significancia para un par de loci, y los par de loci para los cuales se encontró significancia. Desviación significativa cuando $P < 0,05$

Tabla 11. Estadístico F_{IS} calculado para cada población y F_{IT} calculado como un promedio de todas las poblaciones

Población	F_{IS}	F_{IT}
Lloa (L)	0,06293	
Quebrada Cruz Loma (T)	0,13105*	
Monteserrín Bajo (M)	0,02826	0.16627
Pasochoa (P)	0,20000*	
Peñas Blancas (C)	0,03030	
Antisanillo (A)	0,23406**	

* Valor significativo $P < 0,05$; ** Valor altamente significativo $P < 0,01$

Tabla 12. Valores F_{ST} por parejas de poblaciones ordenados de menor valor a mayor

Poblaciones comparadas	F_{ST}
Pasochoa-Peñas B.	0,02446
Lloa-Monteserrín B.	0,04208
Quebrada C.L.-Antisanillo	0,04398
Quebrada C.L.-Monteserrín B.	0,04536
Lloa-Quebrada C.L.	0,05368
Peñas B.-Antisanillo	0,05395
Quebrada C.L.-Peñas B.	0,05412
Monteserrín B.-Antisanillo	0,05414
Pasochoa-Antisanillo	0,05928
Lloa-Pasochoa	0,06385
Lloa-Peñas B.	0,06535
Lloa-Antisanillo	0,06604
Monteserrín B.-Peñas B.	0,06851
Monteserrín B.-Pasochoa	0,07118
Quebrada C.L.-Pasochoa	0,08055

*Los valores en rojo indican poca diferenciación genética, los valores en negro indican diferenciación genética moderada

Tabla 13. Distancia geográfica entre cada par de poblaciones estudiadas (en kilómetros)

	Lloa	Quebrada Cruz L.	Mont. Bajo	Pasochoa	Peñas Blancas	Antisanillo
Lloa	0					
Quebrada Cruz L.	8,3502	0				
Mont. Bajo	39,8045	31,6258	0			
Pasochoa	22,7698	26,5848	48,4704	0		
Peñas Blancas	38,394	33,47	25,6884	33,2495	0	
Antisanillo	40,4736	38,3461	39,5870	26,8096	14,3718	0

Las distancias geográficas son distancias lineales. Fueron calculadas a partir de la coordenadas tomadas en los lugares de colecta. Se transformó las coordenadas a distancias en km con una calculadora en el sitio web <http://www.nau.edu/~cvm/latlongdist.html>

Tabla 14. Distancia geográfica entre cada par de poblaciones (transformadas a ln km)

	Lloa	Quebrada Cruz L.	Mont. Bajo	Pasochoa	Peñas Blancas	Antisanillo
Lloa	0					
Quebrada Cruz L.	2,12229	0				
Mont. Bajo	3,68398	3,45397	0			
Pasochoa	3,12544	3,28034	3,88095	0		
Peñas Blancas	3,64790	3,51065	3,24604	3,50404	0	
Antisanillo	3,70065	3,64665	3,67850	3,28876	2,66527	0

Tabla 15. AMOVA (locus por locus)

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje Variación
Entre poblaciones	24.682	0.09557	5.73660
Dentro poblaciones	328.789	1.57035	94.26340
Total	353.472	1.66592	

P < 0,0000** = altamente significativo

Tabla 16. Distancias geográficas según flujo génico en poblaciones del intervale o de la cordillera hacia el intervale (en km)

Flujo génico más alto		Flujo génico más bajo	
Monteserrín B. y Quebrada C.L.	31,63	Monteserrín B. y Pasochoa	48,47
		Monteserrín B. y Peñas B.	25,69
Pasochoa y Peñas Blancas	33,25	Quebrada C.L. y Pasochoa	26,58
		Quebrada C.L y Peñas B.	33,47

11. ANEXOS

Anexo 1. Trampa para la captura de *D. mesophragmatica*. Botella, capuchón y banano.

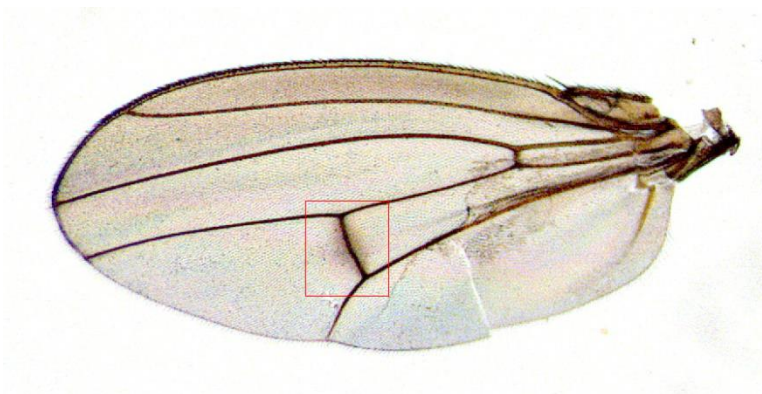


Anexo 2. Características morfológicas de *D. mesophragmatica*

A. *D. mesophragmatica* vista panorámica



B. *D. mesophragmatica* escutelo mostrando las cerdas escutelares anteriores divergentes

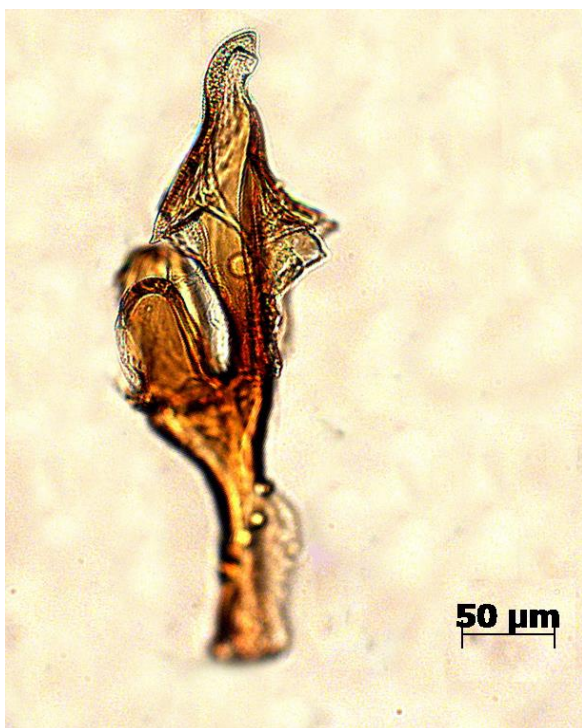


C. Ala de *D. mesophragmatica* mostrando la vena transversal posterior

Anexo 3. Estructuras útiles para la identificación de *D. mesophragmatica*: A. Genitalia externa (epandrio), B. Genitalia interna (falo)



A. Epandrio



B. Falo

Anexo 4. Protocolo de extracción de ADN

EXTRACCIÓN DE ADN

PROTOCOLO FENOL-CLOROFORMO

- Homogenizar cada espécimen en un tubo de 1.5mL con 200uL de DEB fresco y colocarlo sobre hielo.
- Enjuagar bien el pistilo y secar.
- Añadir 5uL de proteinasa K (20mg/mL) y 2uL de RNasa A, vórtex suave por 5seg. e incubar a 50°C durante 60min.
- Añadir 200uL de cloroformo alcohol isoamílico (24:1), vórtex suave por 7seg. y centrifugar por 10min. a 14000rpm. Sacar el sobrenadante a un tubo limpio y repetir el paso pero centrifugando solamente 5 min.
- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio de 1.5mL limpio.
- Añadir 500uL de etanol 95%. y pipetear bien.
- Almacenar a -20°C durante 30min. o toda la noche.
- Centrifugar a 14000rpm durante 10min. y descartar el sobrenadante
- Añadir 300uL de etanol 70% helado y vórtex brevemente a máxima velocidad.
- Centrifugar a 14000rpm durante 5min. y descartar el sobrenadante tratando de sacar la mayor cantidad de etanol posible.
- Incubar a 37°C con la tapa abierta hasta que se evapore todo el etanol.
- Resuspender el pellet en 40uL de solución agua ultra pura.

Buffer DEB: (50 extracciones)

0.5mL SDS 10%

0.4mL NaCl 5M

0.5mL EDTA 0.5M

0.1mL Tris 1M pH8

8.5mL ddi H₂O

- **SDS 10%:** 100g SDS en 900mL de H₂O, calentar a 68°C para disolver. Ajustar el pH a 7.2 añadiendo HCl concentrado. Ajustar el volumen a 1L con H₂O.
Autoclavar.
- **NaCl 5M:** Disolver 292.2g de NaCl en 800mL de H₂O. Ajustar el volumen a 1L.
Autoclavar.
- **EDTA 0.5M:** Añadir 186.1g de EDTA*2H₂O en 800mL de H₂O. Mezclar y ajustar el pH a 8 con NaOH (~20g NaOH). Autoclavar.
- **Tris 1M:** 121.1g Tris/1L más ~ 40.3mL HCl

Anexo 5. Protocolo gel de poliacrilamida

GEL POLIACRILAMIDA

TRATAMIENTO VIDRIOS

1. Poner incubadora a 55°C y colocar plástico en la mesa. Lavar vidrios y colocarlos sobre espumaflex.
2. Pesar 24g de úrea (30g para gel grande) y añadir 16ml de TBE 5x (20ml gel grande). Incubar esto con papel aluminio tapando el vaso.
3. Tratar los vidrios. Primero limpiar los vidrios 3 veces con un chorro de etanol al 95% moviendo el papel en los dos sentidos.

VIDRIO ATRAYENTE

Solución atrayente: 1 ml etanol 95%, 5ul ac. acético glacial, 3ul Bind Silane
Tratar una vez a los dos sentidos, esperar 5 min. y limpiar con 0,5ml etanol 95% en 1 solo sentido.

VIDRIO REPELENTE

Tratar una vez con 1,5ml RAIN®
a los dos sentidos.

4. Lavar los tres separadores y peine y limpiar con etanol 95%.
5. Poner separadores en vidrio atrayente, colocar repelente encima. Ver que estén bien empatados los separadores y colocar pinzas.
6. Poner úrea en agitación. Medir 12ul de poliacrilamida y añadir a úrea. Poner todo en probeta y aforar a 80ml con agua miliQ.
7. Añadir los 2 catalizadores al mismo tiempo.
 - a. 500 ul de Persulfato de amonio al 10% (0.1g en 1ul agua)
 - b. 50ul TEMED
8. Verter solución, colocar peine.

CORRIDA

1. Sacar peine y separador de abajo (con cuidado de no dañar frente de migración)
2. Poner TBE 1X en la parte de abajo (verificar que válvula esté cerrada)
3. Colocar gel en cámara y poner TBE 1X arriba.
4. Limpiar frente de migración y colocar peine.
5. Precalentar gel con programa de 1500 voltios durante 30 minutos.

6. Limpiar otra vez, denaturar las muestras. Cargar más o menos 2ul y correr con programa 1500 voltios durante 2 horas si las bandas son de 130pb a 200pb y 1h40 si las bandas son de 100pb.

TINCIÓN

1. Fijación en ac. acético durante por lo menos 20 minutos y hasta una noche.
Recuperar ac. acético en botella.
2. 3 lavados de 2 minutos con 1L de agua miliQ.
3. Añadir formaldehído y nitrato de plata al litro de agua.
4. 45 minutos en nitrato de plata, desechar nitrato en bandeja grande.
5. Pasarle agua al vidrio parado.
6. Añadir formaldehído y tiosulfato de sodio a los carbonatos.
7. Revelar: poner primer litro de carbonato y agitar hasta ver las primeras bandas de amplificadas. Se desecha carbonato en bandeja grande y se pone el nuevo carbonato, se agita un poco más hasta ver las bandas.
8. Verter ac. acético recuperado y dejar 5 min.
9. Botar todo en lavabo y poner 1L de agua, dejar 10-15 minutos sin agitar.

PREPARACION SOLUCIONES

1. Ácido acético 10%: 100 ml ác. Acético glacial más 900ml agua)
2. Nitrato de plata 1%: 4 ml stock (8ml stock 12.5%) en 1 L de agua y 1.5ml formaldehído. **VERTER ESTO MOMENTOS ANTES DE AÑADIR NITRATO.**
3. Carbonato de sodio 3%: 2 litros con 60 gramos
30 gr/litro más 1.5ml de formaldehído y 300ul de tiosulfato de sodio que se añaden justo antes de verter solución.

Para preparar se pesa 60gr de carbonato y se pone en 800 ml de agua. Se agita hasta q esté disuelto. Se divide 400ml en cada botellón y se añade 600ml de agua.

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica*

5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
L01	L	131	131	79	79	140	156	187	179	68	68
L02	L	129	129	79	79	140	158	177	169	60	66
L03	L	129	129	79	79	158	158	187	177	60	68
L04	L	129	129	79	79	174	174	177	177	68	68
L05	L	129	129	79	79	156	160	189	171	68	68
L06	L	129	131	75	79	156	158	175	167	68	68
L07	L	119	129	75	79	140	160	169	165	68	68
L08	L	119	129	75	79	158	158	173	165	66	66
L09	L	129	131	79	79	158	158	175	171	64	68
L10	L	119	129	75	79	140	158	177	169	66	74
L11	L	119	129	77	79	158	158	171	171	66	74
L12	L	119	129	79	79	144	158	183	179	64	68
L13	L	129	131	79	79	140	158	185	175	64	64
L14	L	119	129	79	79	140	158	173	169	68	68
L15	L	119	129	75	79	158	160	171	171	64	68
L16	L	129	131	75	79	158	158	185	171	60	60
L17	L	119	129	79	79	158	158	173	165	66	74
L18	L	129	131	79	79	160	158	185	167	0	0
L19	L	119	129	79	79	158	158	175	175	66	66
L20	L	119	129	79	79	158	140	175	165	68	68
T01	T	129	129	79	79	140	158	185	181	68	68
T02	T	129	129	79	79	140	140	177	173	60	68

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica* (continuación)

5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
T03	T	129	131	77	79	156	158	181	173	60	68
T04	T	129	131	79	79	156	174	183	181	64	64
T05	T	129	129	79	79	156	174	181	163	68	68
T06	T	119	129	79	79	160	160	177	163	68	68
T07	T	119	129	79	79	160	160	177	171	0	0
T08	T	119	129	79	79	156	158	177	177	68	68
T09	T	129	131	79	79	158	170	173	173	68	68
T10	T	119	129	79	79	156	158	181	177	68	68
T11	T	119	129	77	79	156	156	179	175	60	60
T12	T	119	129	79	79	160	160	183	173	64	68
T13	T	129	131	77	79	156	156	191	191	60	60
T14	T	129	131	77	79	170	170	177	177	60	68
T15	T	119	129	79	79	160	160	173	169	60	60
T16	T	119	129	79	79	150	174	179	179	56	68
T17	T	119	129	79	79	158	158	179	173	0	0
T18	T	129	129	77	79	156	174	181	171	0	0
T19	T	129	131	77	79	156	156	173	173	68	68
T20	T	119	129	77	79	156	156	181	173	56	64
M01	M	119	129	79	79	158	158	173	165	68	68
M02	M	121	131	79	79	156	158	177	171	68	68
M03	M	119	129	75	79	156	164	175	165	68	68

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica* (continuación)

5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
M04	M	129	131	79	79	156	174	173	165	64	64
M05	M	129	131	79	79	156	164	187	179	64	64
M06	M	119	129	75	79	150	150	179	175	64	68
M07	M	129	131	79	79	150	156	175	175	68	68
M08	M	119	129	75	79	140	150	175	175	68	68
M09	M	129	131	79	79	140	160	175	175	64	68
M10	M	119	129	75	79	140	150	175	175	68	68
M11	M	129	129	79	79	150	158	173	165	64	68
M12	M	119	129	75	79	156	174	173	173	64	68
M13	M	119	129	79	79	158	158	173	167	68	68
M14	M	119	129	79	79	140	156	177	177	68	68
M15	M	129	131	79	79	158	158	175	175	68	68
M16	M	119	129	79	79	158	158	177	177	68	68
M17	M	119	129	79	79	140	150	187	173	64	68
M18	M	119	129	79	79	140	156	173	167	64	68
M19	M	119	129	79	79	156	158	177	173	68	68
M20	M	119	129	79	79	140	156	183	175	64	64
P01	P	129	129	79	79	0	0	185	175	64	64
P02	P	129	129	79	79	156	156	181	175	60	68
P03	P	129	131	79	79	150	150	175	175	60	60
P04	P	129	131	79	79	156	156	179	167	64	66

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica* (continuación)

5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
P05	P	119	129	79	79	158	156	175	175	64	72
P06	P	119	129	79	79	160	140	173	165	72	72
P07	P	129	131	79	79	174	158	187	165	64	66
P08	P	119	129	79	79	158	158	187	175	64	64
P09	P	119	129	79	79	158	158	179	179	64	64
C01	C	129	129	79	79	156	158	175	165	66	60
C02	C	129	129	79	79	152	156	175	171	66	68
C03	C	129	129	77	79	156	156	175	175	66	66
C04	C	129	131	77	79	152	156	175	175	0	0
C05	C	129	131	77	79	152	156	175	175	58	64
C06	C	121	131	77	79	152	156	175	167	68	72
C07	C	121	131	77	79	152	156	175	171	68	72
C08	C	119	129	77	79	156	156	171	167	58	64
C09	C	119	129	77	79	160	160	175	165	68	68
C10	C	119	129	77	79	150	158	185	175	58	60
C11	C	129	131	77	79	156	156	175	167	60	66
C12	C	119	129	79	79	140	158	175	169	60	66
C13	C	119	129	79	79	158	158	187	175	64	60
C14	C	129	131	79	79	140	140	175	167	64	64
C15	C	119	129	79	79	156	156	171	167	68	64
C16	C	129	131	79	79	140	158	185	177	60	64

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica* (continuación)

5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
C17	C	131	131	77	79	158	158	179	179	66	66
C18	C	119	129	79	79	156	156	181	175	60	68
C19	C	119	129	79	79	152	156	177	177	68	68
C20	C	119	129	79	79	156	156	177	169	64	64
A01	A	129	129	79	79	158	158	167	167	68	68
A02	A	119	129	79	79	156	160	179	171	64	64
A03	A	129	129	79	79	156	156	185	171	64	64
A04	A	129	129	79	79	158	158	175	167	66	66
A05	A	129	129	79	79	150	156	175	171	68	68
A06	A	119	129	75	79	140	150	187	187	64	74
A07	A	129	129	79	79	156	156	173	173	66	66
A08	A	119	129	79	79	156	156	177	177	66	78
A09	A	119	129	75	79	156	156	177	177	66	78
A10	A	119	129	75	79	140	140	177	167	66	66
A11	A	119	129	75	79	156	156	177	173	64	74
A12	A	129	131	79	79	140	160	177	173	68	68
A13	A	129	129	79	79	150	156	173	173	68	68
A14	A	129	129	75	79	150	174	173	173	60	68
A15	A	119	129	75	79	150	156	175	175	66	66
A16	A	119	129	79	79	140	156	185	179	68	68
A17	A	129	129	75	79	150	174	169	169	64	68

Anexo 6. Base de datos obtenida de la lectura de geles de cada marcador en las seis poblaciones de *D. mesophragmatica* (continuación)

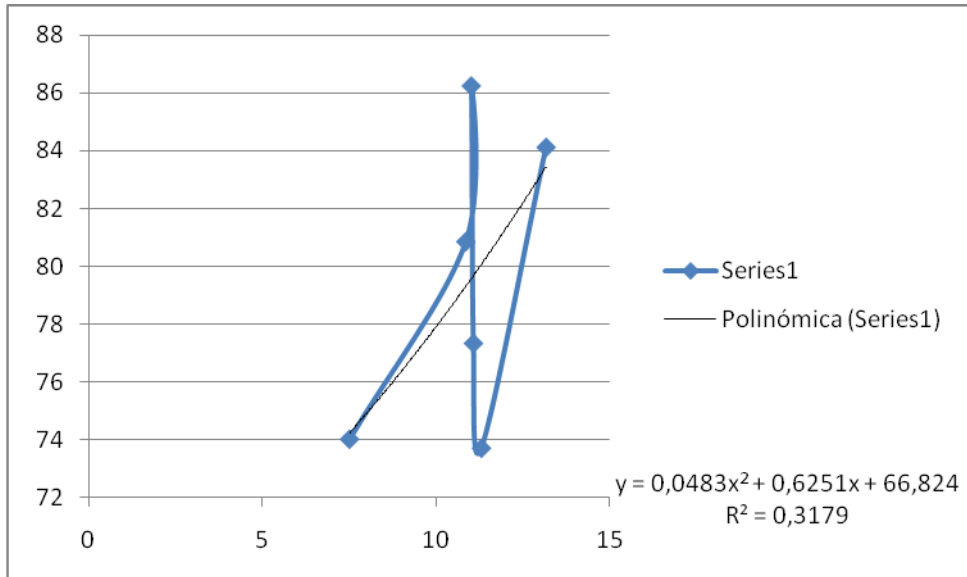
5 loci	109 individuos	6 poblaciones									
		MARCADORES									
Muestra	Población	3101		3030		5200		2302		3020	
A18	A	129	129	75	79	150	156	179	179	64	78
A19	A	129	129	75	79	150	156	179	179	64	78
A20	A	119	129	75	79	150	156	187	187	64	68

Anexo 7. Correlación entre temperatura y humedad relativa en las diferentes localidades

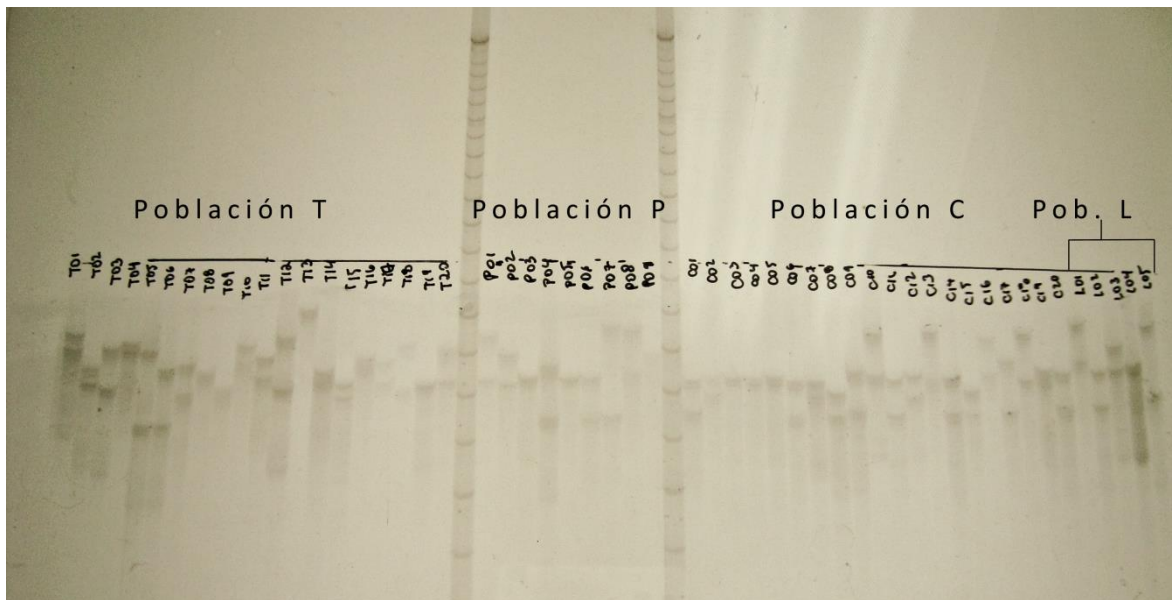
A. Tabla de la temperatura y humedad relativa de cada localidad

	Temperatura °C	Humedad relativa %
Peñas Blancas	7,52	74,04
Antisanillo	10,86	80,86
Pasochoa	11,02	86,24
Lloa	11,08	77,35
Quebrada Cruz Loma	11,31	73,73
Monteserrín Bajo	13,17	84,12

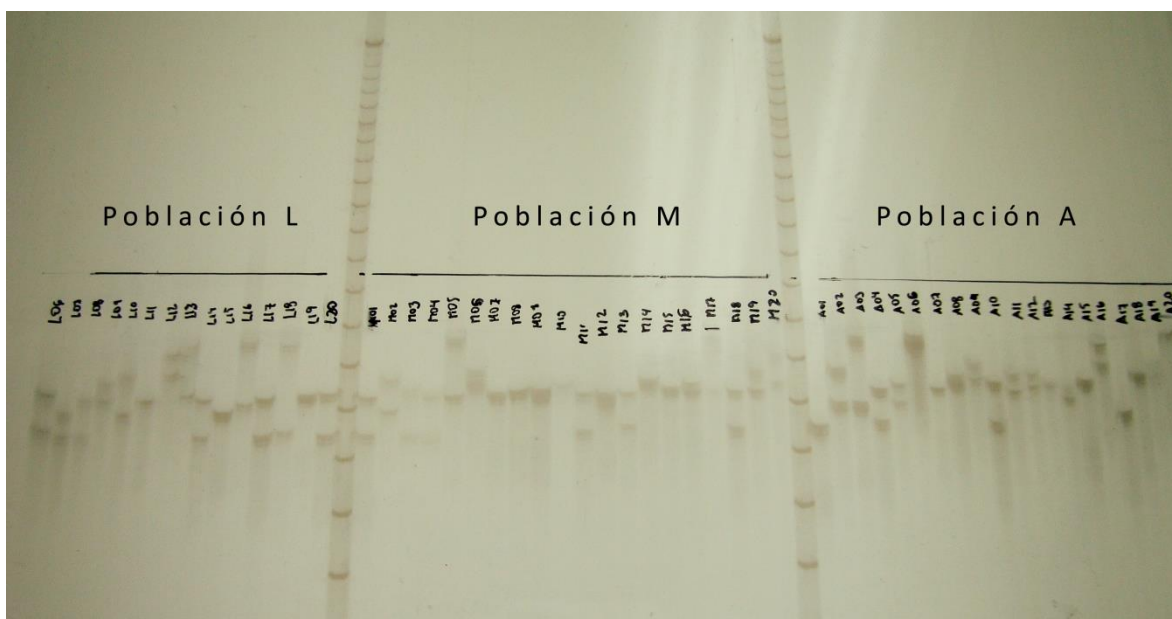
B. Gráfico y correlación obtenidos



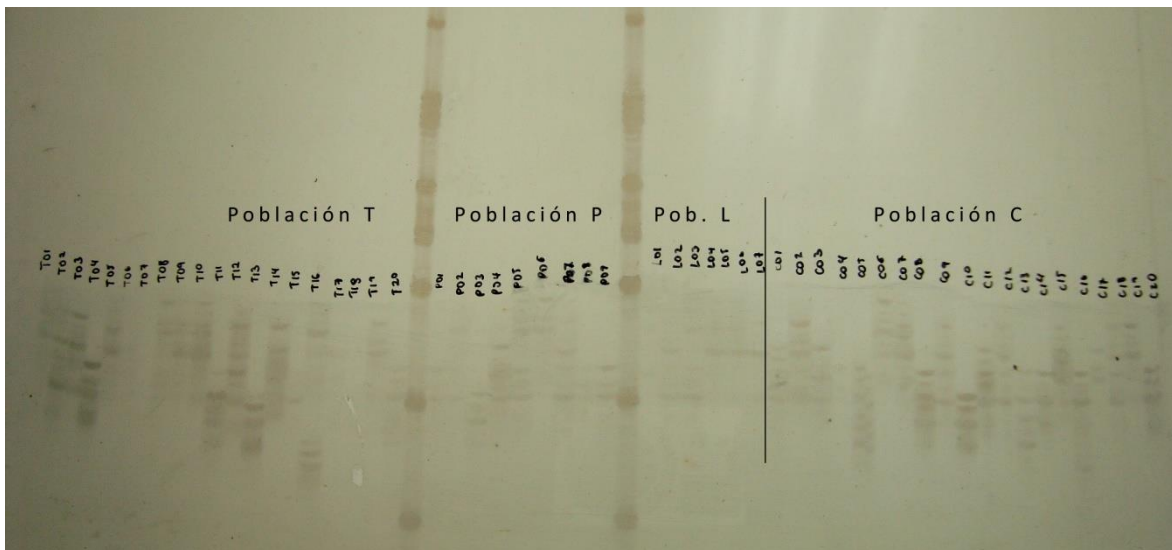
Anexo 8. Geles de poliacrilamida



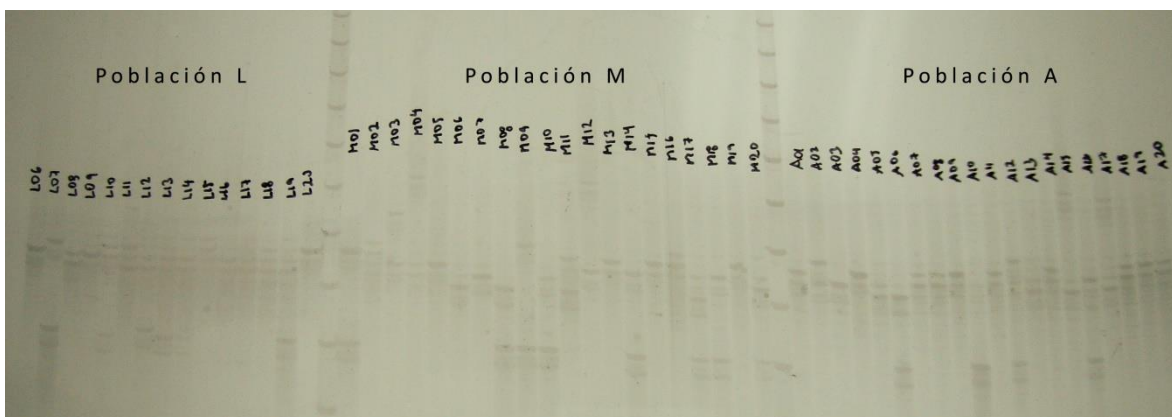
A. Poblaciones T, P, C y algunos individuos de Población L del locus 2302



B. Poblaciones M, A e individuos restantes de Población L del locus 2302



C. Poblaciones T, P, C y algunos individuos de Población L del locus 3020



D. Poblaciones M, A e individuos restantes de Población L del locus 5200

Anexo 9. Frecuencias Alélicas (resaltado en amarillo las frecuencias del alelo más frecuente según el locus y la población; resaltado en rojo las frecuencias de los alelos únicos)

Frecuencia alélica 3101

Alelo	L	T	M	P	C	A
119	0.25000	0.25000	0.32500	0.22222	0.22500	0.22500
121	0.00000	0.00000	0.02500	0.00000	0.05000	0.00000
129	0.57500	0.60000	0.50000	0.61111	0.50000	0.75000
131	0.17500	0.15000	0.15000	0.16667	0.22500	0.02500

Frecuencia alélica 3030

Alelo	L	T	M	P	C	A
75	0.15000	0.00000	0.12500	0.00000	0.00000	0.25000
77	0.02500	0.17500	0.00000	0.00000	0.25000	0.00000
79	0.82500	0.82500	0.87500	1.00000	0.75000	0.75000

Frecuencia alélica 5200

Alelo	L	T	M	P	C	A
140	0.17500	0.07500	0.17500	0.06250	0.10000	0.12500
144	0.02500	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
150	0.00000	0.02500	0.17500	0.12500	0.02500	0.22500
152	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000	0.15000	0.00000
156	0.07500	0.35000	0.25000	0.31250	0.47500	0.45000
158	0.57500	0.17500	0.27500	0.37500	0.20000	0.10000
160	0.10000	0.20000	0.02500	0.06250	0.05000	0.05000
164	0.00000	0.00000	0.05000	0.00000	0.00000	0.00000
170	0.00000	0.07500	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
174	0.05000	0.10000	0.05000	0.06250	0.00000	0.05000

Anexo 10. Índices de diversidad estándar para cada población

Locus 1 (3101), Locus 2 (3030), Locus 3 (5200), Locus 4 (2302), Locus 5 (3020)

Lloa (L)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	40	3	0.75000	0.59103	12	0.23077
2	40	3	0.35000	0.30385	4	0.60000
3	40	6	0.60000	0.63590	34	0.17143
4	40	12	0.80000	0.91410	24	0.48000
5	38	5	0.42105	0.71550	14	0.33333
Mean	39.600	5.800	0.58421	0.63208	17.600	0.36311
s.d.	0.894	3.701	0.19734	0.22132	11.610	0.17672

Quebrada Cruz Loma (T)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	40	3	0.80000	0.56923	12	0.23077
2	40	2	0.35000	0.29615	2	0.66667
3	40	7	0.45000	0.80513	34	0.20000
4	40	11	0.70000	0.86667	28	0.37931
5	34	4	0.35294	0.61854	12	0.30769
Mean	38.800	5.400	0.53059	0.63114	17.600	0.35689
s.d.	2.683	3.647	0.20733	0.22470	13.069	0.18669

Monteserrín bajo (M)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	40	4	0.95000	0.63718	12	0.30769
2	40	2	0.25000	0.22436	4	0.40000
3	40	7	0.75000	0.81538	34	0.20000
4	40	9	0.60000	0.82308	22	0.39130
5	40	2	0.30000	0.43077	4	0.40000
Mean	40.000	4.800	0.57000	0.58615	15.200	0.33980
s.d.	0.000	3.114	0.29707	0.25803	12.853	0.08729

Pasochoa (P)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	18	3	0.77778	0.58170	12	0.23077
3	16	6	0.37500	0.78333	34	0.17143
4	18	8	0.66667	0.83007	22	0.34783
5	18	5	0.44444	0.71895	12	0.38462
Mean	17.500	5.500	0.56597	0.72851	20.000	0.28366
s.d.	1.000	2.082	0.18818	0.10796	10.456	0.09950

Peñas Blancas (C)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	40	4	0.80000	0.66282	12	0.30769
2	40	2	0.50000	0.38462	2	0.66667
3	40	6	0.50000	0.71667	20	0.28571
4	40	10	0.75000	0.79231	22	0.43478
5	38	6	0.68421	0.82219	14	0.40000
Mean	39.600	5.600	0.64684	0.67572	14.000	0.41897
s.d.	0.894	2.966	0.14020	0.17438	7.874	0.15174

Antisanillo (A)

Results are only shown for polymorphic loci

Locus#	Num. gene copies	Num. alleles	Obs. Het.	Exp. Het	Allelic range	G-W stat.
1	40	3	0.50000	0.39615	12	0.23077
2	40	2	0.50000	0.38462	4	0.40000
3	40	6	0.60000	0.73462	34	0.17143
4	40	9	0.40000	0.88846	20	0.42857
5	40	6	0.45000	0.77564	18	0.31579
Mean	40.000	5.200	0.49000	0.63590	17.600	0.30931
s.d.	0.000	2.775	0.07416	0.23113	11.082	0.10917

Anexo 11. Pruebas exactas de equilibrio Hardy-Weinberg : Locus 1 (3101), Locus 2 (3030), Locus 3 (5200), Locus 4 (2302), Locus 5 (3020). Los recuadros celestes y rojos indican desviaciones significativas ($P < 0,05$) y altamente significativas ($P < 0,01$) respectivamente

Lloa (L)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
 Forecasted chain length :1000000
 Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	20	0.75000	0.59103	0.04555	0.00021	1001000
2	20	0.35000	0.30385	1.00000	0.00000	1001000
3	20	0.60000	0.63590	0.25592	0.00046	1001000
4	20	0.80000	0.91410	0.07688	0.00016	1001000
5	19	0.42105	0.71550	0.00036	0.00002	1001000

Quebrada Cruz Loma (T)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
 Forecasted chain length :1000000
 Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	20	0.80000	0.56923	0.03167	0.00017	1001000
2	20	0.35000	0.29615	1.00000	0.00000	1001000
3	20	0.45000	0.80513	0.00008	0.00001	1001000
4	20	0.70000	0.86667	0.28326	0.00033	1001000
5	17	0.35294	0.61854	0.02486	0.00016	1001000

Monteserrín bajo (M)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):
 Forecasted chain length :1000000
 Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	20	0.95000	0.63718	0.00028	0.00002	1001000
2	20	0.25000	0.22436	1.00000	0.00000	1001000
3	20	0.75000	0.81538	0.03014	0.00018	1001000
4	20	0.60000	0.82308	0.00174	0.00004	1001000
5	20	0.30000	0.43077	0.28064	0.00046	1001000

Pasochoa (P)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :1000000

Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	9	0.77778	0.58170	0.71158	0.00044	1001000
2	This locus is monomorphic: no test done.					
3	8	0.37500	0.78333	0.00909	0.00009	1001000
4	9	0.66667	0.83007	0.23591	0.00041	1001000
5	9	0.44444	0.71895	0.04773	0.00021	1001000

Peñas Blancas (C)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :1000000

Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	20	0.80000	0.66282	0.01502	0.00012	1001000
2	20	0.50000	0.38462	0.27709	0.00044	1001000
3	20	0.50000	0.71667	0.00054	0.00002	1001000
4	20	0.75000	0.79231	0.40882	0.00032	1001000
5	19	0.68421	0.82219	0.11149	0.00031	1001000

Antisanillo (A)

Exact test using a Markov chain (for all Loci):

Forecasted chain length :1000000

Dememorization steps :100000

Locus	#Genot	Obs.Het.	Exp.Het.	P-value	s.d.	Steps done
1	20	0.50000	0.39615	0.63782	0.00048	1001000
2	20	0.50000	0.38462	0.27772	0.00046	1001000
3	20	0.60000	0.73462	0.00469	0.00006	1001000
4	20	0.40000	0.88846	0.00000	0.00000	1001000
5	20	0.45000	0.77564	0.00008	0.00001	1001000

Anexo 12. Pruebas de desequilibrio ligado para cada par de loci con sus tablas de significancia Locus 0 (3101), Locus 1 (3030), Locus 2 (5200), Locus 3 (2302), Locus 4 (3020). Están los valores de la prueba para cada par de loci en cada población y el valor de la significancia después de haber realizado las permutaciones. Luego hay una tabla de la significancia de desequilibrio ligado en donde los signos positivos indican un desequilibrio ligado significativo (P<0,05).

Lloa (L)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

```
-----
Permutation test using the EM algorithm
Number of permutations      : 1000
Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)
LnLHood LD : -42.01575      LnLHood LE : -44.96222
Exact P= 0.15640 +- 0.01116 (1023 permutations done)
Pair(0, 2)
LnLHood LD : -67.29419      LnLHood LE : -71.66675
Exact P= 0.75171 +- 0.01268 (1023 permutations done)
Pair(1, 2)
LnLHood LD : -58.18281      LnLHood LE : -59.84021
Exact P= 0.96774 +- 0.00505 (1023 permutations done)
Pair(0, 3)
LnLHood LD : -95.92684      LnLHood LE : -110.59918
Exact P= 0.23265 +- 0.01314 (1023 permutations done)
Pair(1, 3)
LnLHood LD : -93.49405      LnLHood LE : -98.77264
Exact P= 0.94135 +- 0.00729 (1023 permutations done)
Pair(2, 3)
LnLHood LD : -99.29190      LnLHood LE : -125.47716
Exact P= 0.02151 +- 0.00402 (1023 permutations done)
Pair(0, 4)
LnLHood LD : -77.34006      LnLHood LE : -83.46766
Exact P= 0.45846 +- 0.01525 (1023 permutations done)
Pair(1, 4)
LnLHood LD : -68.79643      LnLHood LE : -71.64112
Exact P= 0.85239 +- 0.01113 (1023 permutations done)
Pair(2, 4)
LnLHood LD : -87.91742      LnLHood LE : -98.34564
Exact P= 0.62659 +- 0.01611 (1023 permutations done)
Pair(3, 4)
LnLHood LD : -116.11088     LnLHood LE : -137.27807
Exact P= 0.90323 +- 0.00812 (1023 permutations done)
```

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

Locus #	0	1	2	3	4
0	*	-	-	-	-
1	-	*	-	-	-
2	-	-	*	+	-
3	-	-	+	*	-
4	-	-	-	-	*

Quebrada Cruz Loma (T)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 1000

Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)

LnLHood LD : -38.07815 LnLHood LE : -40.11215
Exact P= 0.12512 +- 0.00863 (1023 permutations done)

Pair(0, 2)

LnLHood LD : -79.78266 LnLHood LE : -88.39142
Exact P= 0.17986 +- 0.01355 (1023 permutations done)

Pair(1, 2)

LnLHood LD : -69.98082 LnLHood LE : -75.67332
Exact P= 0.08113 +- 0.01046 (1023 permutations done)

Pair(0, 3)

LnLHood LD : -90.98442 LnLHood LE : -99.89313
Exact P= 0.83578 +- 0.01215 (1023 permutations done)

Pair(1, 3)

LnLHood LD : -83.29396 LnLHood LE : -87.17504
Exact P= 0.84360 +- 0.01080 (1023 permutations done)

Pair(2, 3)

LnLHood LD : -111.20762 LnLHood LE : -135.45430
Exact P= 0.51417 +- 0.01617 (1023 permutations done)

Pair(0, 4)

LnLHood LD : -73.17670 LnLHood LE : -76.41003
Exact P= 0.75855 +- 0.01146 (1023 permutations done)

Pair(1, 4)

LnLHood LD : -61.26284 LnLHood LE : -63.69193
Exact P= 0.40762 +- 0.01332 (1023 permutations done)

Pair(2, 4)

LnLHood LD : -101.40280 LnLHood LE : -111.97120
Exact P= 0.73900 +- 0.01285 (1023 permutations done)

Pair(3, 4)

LnLHood LD : -101.59466 LnLHood LE : -123.47291
Exact P= 0.09775 +- 0.00828 (1023 permutations done)

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

Locus #	0	1	2	3	4
0	*	-	-	-	-
1	-	*	-	-	-
2	-	-	*	-	-
3	-	-	-	*	-
4	-	-	-	-	*

Monteserrín bajo (M)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 1000
 Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)
 LnLHood LD : -39.03746 LnLHood LE : -41.98091
 Exact P= 0.12414 +- 0.01110 (1023 permutations done)

Pair(0, 2)
 LnLHood LD : -78.11513 LnLHood LE : -88.11578
 Exact P= 0.25513 +- 0.01309 (1023 permutations done)

Pair(1, 2)
 LnLHood LD : -64.59974 LnLHood LE : -69.34501
 Exact P= 0.13001 +- 0.01090 (1023 permutations done)

Pair(0, 3)
 LnLHood LD : -87.56512 LnLHood LE : -96.03927
 Exact P= 0.83382 +- 0.00972 (1023 permutations done)

Pair(1, 3)
 LnLHood LD : -74.72123 LnLHood LE : -77.26850
 Exact P= 0.80841 +- 0.00978 (1023 permutations done)

Pair(2, 3)
 LnLHood LD : -105.83338 LnLHood LE : -123.40337
 Exact P= 0.80059 +- 0.01182 (1023 permutations done)

Pair(0, 4)
 LnLHood LD : -49.61663 LnLHood LE : -50.65153
 Exact P= 0.68035 +- 0.01545 (1023 permutations done)

Pair(1, 4)
 LnLHood LD : -31.33442 LnLHood LE : -31.88076
 Exact P= 0.39492 +- 0.01188 (1023 permutations done)

Pair(2, 4)
 LnLHood LD : -72.22435 LnLHood LE : -78.01563
 Exact P= 0.09580 +- 0.00954 (1023 permutations done)

Pair(3, 4)
 LnLHood LD : -77.82498 LnLHood LE : -85.93912
 Exact P= 0.05083 +- 0.00603 (1023 permutations done)

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

Locus #	0	1	2	3	4
0	*	-	-	-	-
1	-	*	-	-	-
2	-	-	*	-	-
3	-	-	-	*	-
4	-	-	-	-	*

Pasochoa (P)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 1000

Number of initial conditions for EM : 2

```

Pair(0, 1)
  LnLHood LD :    0.00000          LnLHood LE :    0.00000
  Exact P= 1.00000 +- 0.00000 (0 permutations done)
Pair(0, 2)
  LnLHood LD :  -33.65152          LnLHood LE :  -40.33371
  Exact P= 0.38123 +- 0.01472 (1023 permutations done)
Pair(1, 2)
  LnLHood LD :    0.00000          LnLHood LE :    0.00000
  Exact P= 1.00000 +- 0.00000 (0 permutations done)
Pair(0, 3)
  LnLHood LD :  -34.96859          LnLHood LE :  -40.13481
  Exact P= 0.96188 +- 0.00465 (1023 permutations done)
Pair(1, 3)
  LnLHood LD :    0.00000          LnLHood LE :    0.00000
  Exact P= 1.00000 +- 0.00000 (0 permutations done)
Pair(2, 3)
  LnLHood LD :  -40.24319          LnLHood LE :  -56.55493
  Exact P= 0.17302 +- 0.01378 (1023 permutations done)
Pair(0, 4)
  LnLHood LD :  -27.15963          LnLHood LE :  -33.45791
  Exact P= 0.13587 +- 0.01002 (1023 permutations done)
Pair(1, 4)
  LnLHood LD :    0.00000          LnLHood LE :    0.00000
  Exact P= 1.00000 +- 0.00000 (0 permutations done)
Pair(2, 4)
  LnLHood LD :  -35.03781          LnLHood LE :  -49.87803
  Exact P= 0.01075 +- 0.00331 (1023 permutations done)
Pair(3, 4)
  LnLHood LD :  -35.90086          LnLHood LE :  -49.67913
  Exact P= 0.14174 +- 0.00988 (1023 permutations done)

```

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

```

-----
Locus # | 0| 1| 2| 3| 4|
-----
0 | *  -  -  -  -
1 | -  *  -  -  -
2 | -  -  *  -  +
3 | -  -  -  *  -
4 | -  -  +  -  *

```

Peñas Blancas (C)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

 Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 1000
 Number of initial conditions for EM : 2

Pair(0, 1)
 LnLHood LD : -49.10962 LnLHood LE : -51.17578
 Exact P= 0.35484 +- 0.01364 (1023 permutations done)

Pair(0, 2)
 LnLHood LD : -80.57656 LnLHood LE : -85.97565
 Exact P= 0.87195 +- 0.01206 (1023 permutations done)

Pair(1, 2)
 LnLHood LD : -62.93471 LnLHood LE : -65.92374
 Exact P= 0.39492 +- 0.01395 (1023 permutations done)

Pair(0, 3)
 LnLHood LD : -84.05216 LnLHood LE : -99.92446
 Exact P= 0.11730 +- 0.01021 (1023 permutations done)

Pair(1, 3)
 LnLHood LD : -76.41921 LnLHood LE : -79.87256
 Exact P= 0.85337 +- 0.00784 (1023 permutations done)

Pair(2, 3)
 LnLHood LD : -96.25119 LnLHood LE : -114.67243
 Exact P= 0.47019 +- 0.01453 (1023 permutations done)

Pair(0, 4)
 LnLHood LD : -87.97921 LnLHood LE : -98.28273
 Exact P= 0.42815 +- 0.01353 (1023 permutations done)

Pair(1, 4)
 LnLHood LD : -69.71459 LnLHood LE : -78.23083
 Exact P= 0.00587 +- 0.00260 (1023 permutations done)

Pair(2, 4)
 LnLHood LD : -94.57763 LnLHood LE : -113.03070
 Exact P= 0.06061 +- 0.00782 (1023 permutations done)

Pair(3, 4)
 LnLHood LD : -103.87336 LnLHood LE : -126.97952
 Exact P= 0.47312 +- 0.01708 (1023 permutations done)

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

 Locus # | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |

 0 | * | - | - | - | -
 1 | - | * | - | - | +
 2 | - | - | * | - | -
 3 | - | - | - | * | -
 4 | - | + | - | - | *

Antisanillo (A)

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:

Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 1000

Number of initial conditions for EM : 2

```

Pair(0, 1)
  LnLHood LD : -32.99698      LnLHood LE : -34.37470
  Exact P= 0.26882 +- 0.01815 (1023 permutations done)
Pair(0, 2)
  LnLHood LD : -63.42827      LnLHood LE : -69.88351
  Exact P= 0.10948 +- 0.00960 (1023 permutations done)
Pair(1, 2)
  LnLHood LD : -62.30362      LnLHood LE : -66.63268
  Exact P= 0.18866 +- 0.01382 (1023 permutations done)
Pair(0, 3)
  LnLHood LD : -89.84051      LnLHood LE : -97.11135
  Exact P= 0.39883 +- 0.01399 (1023 permutations done)
Pair(1, 3)
  LnLHood LD : -90.57271      LnLHood LE : -93.86052
  Exact P= 0.78886 +- 0.01245 (1023 permutations done)
Pair(2, 3)
  LnLHood LD : -105.71368     LnLHood LE : -129.36933
  Exact P= 0.07429 +- 0.00805 (1023 permutations done)
Pair(0, 4)
  LnLHood LD : -69.82534      LnLHood LE : -73.80210
  Exact P= 0.56109 +- 0.01626 (1023 permutations done)
Pair(1, 4)
  LnLHood LD : -65.55012      LnLHood LE : -70.55127
  Exact P= 0.08895 +- 0.00931 (1023 permutations done)
Pair(2, 4)
  LnLHood LD : -95.02124      LnLHood LE : -106.06008
  Exact P= 0.69208 +- 0.01597 (1023 permutations done)
Pair(3, 4)
  LnLHood LD : -111.32807     LnLHood LE : -133.28792
  Exact P= 0.14956 +- 0.01097 (1023 permutations done)

```

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

```

-----
Locus # | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
-----
0 | * | - | - | - | - |
1 | - | * | - | - | - |
2 | - | - | * | - | - |
3 | - | - | - | * | - |
4 | - | - | - | - | * |

```

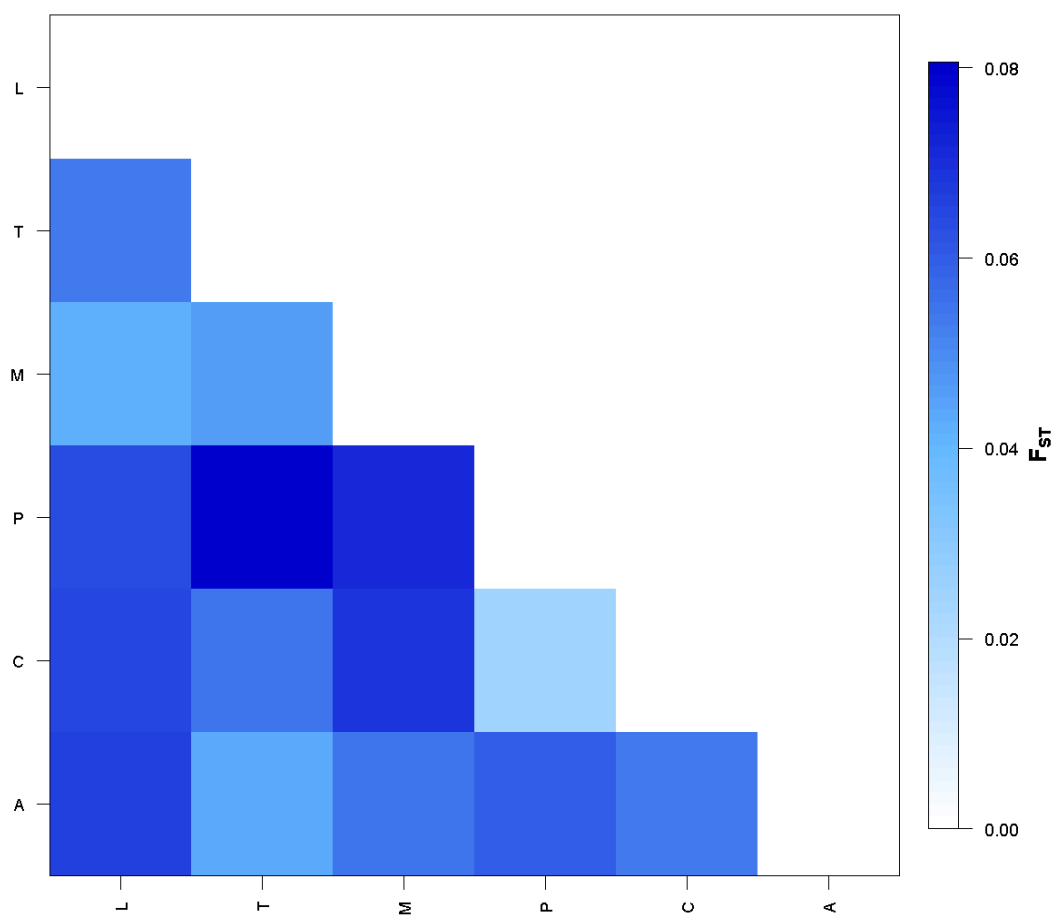
Anexo 13. F_{ST} entre parejas de poblaciones

A. F_{ST} entre parejas de poblaciones. 1 = Lloa, 2 = Quebrada Cruz Loma, 3 = Monteserrín Bajo, 4 = Pasochoa, 5 = Peñas Blancas, 6 = Antisanillo.

Distance method: No. of different alleles (FST)

	1	2	3	4	5	6
1	0.00000					
2	0.05368	0.00000				
3	0.04208	0.04536	0.00000			
4	0.06385	0.08055	0.07118	0.00000		
5	0.06535	0.05412	0.06851	0.02446	0.00000	
6	0.06604	0.04398	0.05414	0.05928	0.05395	0.00000

B. Gráfico F_{ST} entre parejas de poblaciones. L = Lloa, T = Quebrada Cruz Loma, M = Monteserrín Bajo, P = Pasochoa, C = Peñas Blancas, A = Antisanillo.



Anexo 14. Valores de P y tabla de P significativos para los F_{ST}

A. Valores de P. El recuadro rojo indica el único valor que no es significativo ($P < 0,01$)

Number of permutations : 10100

	1	2	3	4	5	6
1	*					
2	0.00010+-0.0001	*				
3	0.00168+-0.0004	0.00139+-0.0004	*			
4	0.00228+-0.0004	0.00099+-0.0004	0.00446+-0.0006	*		
5	0.00000+-0.0000	0.00040+-0.0002	0.00000+-0.0000	0.11009+-0.0032	*	
6	0.00010+-0.0001	0.00317+-0.0006	0.00228+-0.0004	0.00802+-0.0008	0.00000+-0.0000	*

B. Matriz de valores P significativos. El recuadro rojo indica el único valor que no es significativo

Number of permutations : 10100

	1	2	3	4	5	6
1						
2	+					
3	+	+				
4	+	+	+			
5	+	+	+	-		
6	+	+	+	+	+	

Anexo 15. Prueba de Mantel

El recuadro rojo indica el coeficiente de la correlación y el recuadro azul la significancia

```

=====
== MATRIX CORRELATION ANALYSIS (MANTEL TESTS)
=====

Labels of Y matrix rows=(
  "L"
  "T"
  "M"
  "p"
  "C"
  "A"
)
List of matrices:
X1=(
  0 2.12229 3.68398 3.12544 3.6479 3.70065
  2.12229 0 3.45397 3.28034 3.51065 3.64665
  3.68398 3.45397 0 3.88095 3.24604 3.6785
  3.12544 3.28034 3.88095 0 3.50404 3.28876
  3.6479 3.51065 3.24604 3.50404 0 2.66527
  3.70065 3.64665 3.6785 3.28876 2.66527 0
)
Y (custom)=(
  0 0.05368 0.04208 0.06385 0.06535 0.06604
  0.05368 0 0.04536 0.08055 0.05412 0.04398
  0.04208 0.04536 0 0.07118 0.06851 0.05414
  0.06385 0.08055 0.07118 0 0.02446 0.05928
  0.06535 0.05412 0.06851 0.02446 0 0.05395
  0.06604 0.04398 0.05414 0.05928 0.05395 0
)

Mean value Y                : 0.056435
Sums of squares Y           : 0.002710
Mean value X1                : 3.362362

Sums of squares X1          : 2.905083
ZY1                           : 2.844810
Sum of products (SP(Y,X1))  : -0.001530

Regression coefficient (bY1)  : -0.000527
Correlation coefficient (rY1)  : -0.017241
Determination of Y by X1(%)  : 0.000297

Significance testing (1000 permutations for Mantel test)
=====
P(rY1 rand >= rY1 obs)      : 0.480000
No. of smaller rand rY1     : 520
No. of equal rand rY1       : 1
No. of larger rand rY1      : 479

```