

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

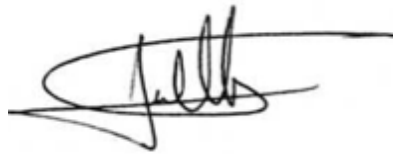
**Mecanismos de colonización de *Lasiocephalus ovatus* Schltdl.
(Asteraceae) en el superpáramo del Antisana. Plasticidad fenotípica,
estructura genética e interacciones con otras especies.**

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

JUAN PABLO ALMEIDA VACA

Quito, 2011.

Certifico que la disertación de Licenciatura de Ciencias Biológicas del Sr. Juan Pablo Almeida ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fabien Anthelme', with a long horizontal stroke extending to the right.

Fabien Anthelme, Ph.D.

Director de la Disertación

Quito, 29 de junio de 2011

A Micaela y a mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, a Micaela y a mis amigos por el apoyo incondicional.

A Fabien Anthelme, Rommel Montúfar y Susana León por guiarme durante el proyecto.

A la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por forjarme como investigador y por el apoyo económico.

Al IRD por el apoyo logístico y económico.

TABLA DE CONTENIDOS

Tema	Página
Lista de figuras.....	IX
Lista de tablas.....	XI
Lista de anexos.....	XII
1. Resumen.....	13
2. Abstract.....	15
3. Introducción.....	17
3.1. Ecosistemas alpinos y cambio climático.....	17
3.2. Rasgos funcionales de vida indicadores de estrategias adaptativas a lo largo de gradientes altitudinales.....	19
3.3. Interacciones entre plantas y variaciones genéticas pueden influir sobre las estrategias de las plantas.....	21
3.4. Objetivos.....	24
3.4.1. Objetivo general.....	24
3.4.2. Objetivos específico.....	24
4. Materiales y métodos.....	25
4.1. Área de estudio.....	25
4.2. Sector de estudio.....	28
4.3. Especie de estudio.....	29

4.4. Diseño observacional.....	31
4.4.1. Gradiente altitudinal.....	31
4.4.1.1 Condiciones microclimáticas	32
4.4.1.2. Nutrientes edáficos	33
4.4.1.3. Cobertura vegetal.....	34
4.4.2 Rasgos funcionales de vida.....	34
4.4.3. Efectos de la planta nodriza <i>Azorella aretioides</i>	36
4.4.1.2 Descripción de las condiciones edáficas generadas por <i>Azorella aretioides</i>	37
4.4.3.1.Rasgos de vida y <i>Azorella aretioides</i>	38
4.4.4. Análisis genéticos.....	38
4.4.4.1. Marcaje molecular	39
4.4.4.2. Análisis de los datos.....	40
4.4.4.2.1. Programa estadístico.....	40
4.4.4.2.2. Distancias genética entre individuos.....	41
4.4.4.2.3. Frecuencias alélicas.....	43
4.4.4.2.4. Índice de Fijación, Test de Mantel.....	43
4.4.4.2.5. Índice de heterocigocidad esperada	44
5 Resultados	
5.1. Descripción del gradiente altitudinal.....	45
5.1.1. Gradiente de estrés abiotico.....	45

5.1.2	Nutrientes edáficos.....	46
5.1.3.	Cobertura vegetal	46
5.2.	Rasgos funcionales de vida.....	47
5.3.	Efectos de la planta nodriza <i>Azorella aretioides</i>	49
5.4.	Variación en rasgos genotípicos a lo largo del gradiente altitudinal.....	51
5.4.1	Heterocigosidad esperada.....	51
5.4.2.	Distancias genéticas.....	52
5.4.3	Fst y Test de Mantel.....	54
6	Discusión	
6.1	Variaciones en los rasgos de vida a través del gradiente.....	55
6.2	Efecto de <i>Azorella aretioides</i> sobre la colonización de <i>Lasiocephalus ovatus</i>	61
6.3.	Estructura genética y gradiente altitudinal.....	64
7.	Conclusiones.....	71
8.	Literatura citada.....	73
9.	Figuras.....	87
10.	Tablas.....	105
11.	Anexos.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Mapa de ubicación del área de estudio.....	88
2. Gradiente altitudinal.....	89
3. Cantidad de materia orgánica y nitrógeno a lo largo del gradiente altitudinal.....	90
4. Cantidad de fósforo y potasio a lo largo del gradiente altitudinal.....	91
5. Porcentaje de cobertura vegetal a lo largo del gradiente altitudinal.....	92
6. Correlación entre los nutrientes del suelo y la cobertura vegetal.....	93
7. Variación de SLA y peso foliar través del gradiente altitudinal.....	94
8. Variación de área foliar y altura de la planta a través del gradiente altitudinal.....	95
9. Variación de la densidad de hojas por longitud de tallo y contenido de nitrógeno foliar a través del gradiente altitudinal.	96
10. Variación del contenido de fosforó y potasio foliar través del gradiente altitudinal.....	97
11. Análisis de componentes principales de los rasgos funcionales de vida.....	98

12. Efecto de <i>Azorella aretioides</i> sobre el magnesio y el potasio del suelo.....	99
13. Efecto de <i>Azorella aretioides</i> sobre la materia orgánica.....	100
14. Efecto de <i>Azorella aretioides</i> sobre el peso de las hojas y Área foliar.....	101
15. Influencia de <i>Azorella aretioides</i> sobre el nitrógeno foliar y magnesio foliar.....	102
16. Análisis de componentes principales de la distancia genética.....	103
17. Correlación entre SLA y He.....	104

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Primers que pudieron ser transferidos a <i>Lasiocephalus ovatus</i>	106
2. Coctel PCR para amplificación de los primers.....	107
3. Datos microclimáticos del gradiente altitudinal.....	108
4. Índices de heterocigocidad esperada (He).....	109
5. Número de alelos de cada población del gradiente altitudinal.....	110
6. Índices de diversidad genética Fst.....	111
7. Matriz de distancias geográficas entre poblaciones.....	112
8. Matriz de distancias microclimáticas.....	113
9. Matriz de distancias usando los nutriente del suelo.....	114

LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
1. <i>Lasiocephalus ovatus</i>	116
2. Metodología para el análisis de suelos.....	117
3. Protocolo para el cálculo de la cobertura vegetal.....	118
4. Marcaje y medición de los individuos de <i>Lasiocephalus ovatus</i>	119
5. Protocolo para el cálculo del área de las hojas.....	120
6. Metodología para el análisis foliar.....	122
7. <i>Azorella aretioides</i>	123

1. RESUMEN

Lasiocephalus ovatus es una especie perenne de alta montaña que habita un amplio rango altitudinal de los superpáramos ecuatorianos. A fin de entender el éxito de *L. ovatus* para colonizar ecosistemas altitudinales se midieron rasgos funcionales de vida, se evaluaron las relaciones interespecíficas (efecto nodriza de *Azorella aretioides*) y la estructuración genética (utilizando 6 microsatélites) entre poblaciones establecidas a lo largo de un gradiente altitudinal (4200m, 4400m, 4500m, 4700m, 4800m) ubicado en el superpáramo del Antisana.

Se encontraron variaciones en los rasgos funcionales de vida al incrementarse la elevación. Sin embargo solo la densidad de hojas y la altura de la planta se correlacionaron linealmente con la elevación; mientras que, el estimado del grosor de la hoja (SLA) y área foliar mostraron patrones más complejos. El incremento de SLA al inicio del gradiente fue interpretado como una estrategia para mejorar la eficiencia fotosintética, la disminución al final del gradiente podría reflejar una estrategia conservativa para la tolerancia al frío.

Nuestros resultados además evidencian un efecto positivo por parte de *A. aretioides* sobre los siguientes rasgos de vida: área y peso foliar, nitrógeno y magnesio foliar. Esto corrobora la hipótesis del gradiente de estrés, en la cual con niveles altos de estrés ambiental las interacciones entre plantas tienden a ser positivas.

La índice de diversidad genética (H_e) alcanzó un valor máximo en la parte intermedia del gradiente altitudinal (4500m). El centro altitudinal de *Lasiocephalus ovatus* (4500 m.) correspondió también a los mayores valores de SLA. Se sugiere que los valores de SLA pueden reflejar un óptimo fisiológico a lo largo del gradiente.

Se concluye que *L. ovatus* puede adaptarse al gradiente altitudinal debido a la plasticidad fenotípica observada en sus rasgos de vida. La diversidad genética podría explicar parcialmente algunas de estas variaciones. Además el efecto nodriza de las almohadillas es capaz de modificar rasgos fenotípicos incrementando la producción de biomasa de la planta y seguramente el fitness de la planta.

Palabras clave: *Lasiocephalus ovatus*, Plasticidad fenotípica, *Azorella aretioides*, SLA, Rasgos funcionales de vida, Efecto de planta nodriza.

2. ABSTRACT

Lasiocephalus ovatus is an evergreen high mountain species that occupies a wide altitudinal range of Ecuadorian Superpáramo. To understand the ability of *L. ovatus* to colonize altitudinal ecosystems we measure plant functional traits, test interspecific relationships (*Azorella aretioides* nurse effect) and genetic differentiation (6 microsatellites) between populations established along an altitudinal gradient (at altitudes of 4200m, 4400m, 4500m, 4700m, 4800m).

We found variations in the plant functional traits with elevation. However only leaf density and plant height correlated linearly with elevation whereas SLA and leaf area show more complex patterns. The increase of SLA at the beginning of the gradient could be interpreted as a resource acquisition strategy by enhancing photosynthetic ability while SLA decrease at the end of the gradient could reflect conservative strategy to the cold stress.

Our results evidenced a positive effect of *A. aretioides* on the following phenotypic traits of *L. ovatus* irrespective of altitudinal variation leaf area leaf weight, N_{mass} foliar and Mg_{mass} foliar, which is coherent with the stress gradient hypothesis according to which at high level of environmental stress interactions among plants are more prone to be facilitative.

On the other hand genetic diversity reached a peak at intermediate elevation 4500 along the gradient. Below and above this point it decreases monotonously. The altitudinal centre of *L.*

ovatus distribution corresponded to the peak in SLA detected for the species suggesting that SLA may reflect the ecophysiological optimum of plants along altitudinal gradients.

We conclude that *L. ovatus* could adapt well to altitudinal gradients because of the phenotypic plasticity. Genetic diversity and differentiation could explain some of this variations. In addition nurse cushions could be able to modify phenotypical traits of *L. ovatus* in order to improve its biomass production.

Key words: *Lasiocephalus ovatus*, Phenotypic plasticity, SLA, *Azorella aretioides*, Plant functional trait, nurse effect.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. ECOSISTEMAS ALPINOS Y CAMBIO CLIMÁTICO

La vida en las altas montañas se encuentra muy exigida, principalmente por los componentes físicos del medio ambiente (Körner, 2003), tales como bajas temperatura, baja presión atmosférica, presiones parciales de CO₂ y alta intensidad lumínica, los cuales a su vez limitan altitudinalmente la distribución las especies (Zhang *et al.*, 2005). Al aumentar la altitud dichas condiciones se vuelven más extremas, especialmente debido al descenso en la temperatura del aire (Körner, 2007). Estos cambios conllevan a una reducción en la biomasa de las especies (Nagy y Grabherr, 2009). Así las bajas temperaturas en conjunto con otros factores climáticos y fisiogeográficos dan forma a los ecosistemas alpinos (Nagy y Grabherr, 2009; Billings, 1973; Körner, 2003).

El Páramo es un caso especial de dicho tipo de hábitat, es conocido también como “ecosistema tropical alpino” (Luteyn 1999, Nagy y Grabherr, 2009). Se encuentran en zona latitudinales donde la estacionalidad es casi nula, y la variación de temperatura diaria es alta (Nagy y Grabherr, 2009 ; Billings, 1973 ; Korner, 2003). Incluye plantas cespitosas, arbustos de hojas coriáceas y perennes, plantas con crecimiento en forma de almohadillas y rosetas gigantes (forma de vida no presente en los hábitats alpino holárticos) (Luteyn, 1999; Nagy y Grabherr, 2009). Debido a dichas condiciones particulares, al hecho de que se encuentran aislados geográficamente, y por su historia geológica particular (Morales y Estévez, 2006) los páramos constituyen uno de los ecosistemas de alta montaña más ricos a nivel de número de especies (Sklenár *et al.*, 2005).

Por estas razones, la vegetación de alta elevación puede ser usada como sensible indicador ecológico (Gottfried y Grabherr, 2003); en un escenario donde el acelerado calentamiento global ha llegado a un nivel en el cual han sido alcanzados los ecosistemas fríos y marginales (Kullman, 2004). Así, recientes proyecciones globales del cambio de temperatura han concluido que durante el siglo XXI se incrementará la temperatura en las superficie de las montañas de dos a tres veces más que en el siglo XX (al final del siglo XXI la temperatura se incrementará de 1.4 a 5.8°C) (Spehn y Körner, 2010 ; Nogues-Bravo, *et al.*, 2007 ; Brandley *et al.*, 2006 , Combes *et al.*,2006).

Por este motivo, los páramos y glaciares son eslabones que aumentan y disminuyen su extensión, según los cambios térmicos atmosféricos, respectivamente (Flórez, 2002). Por ejemplo en el Ecuador los glaciares del volcán Antisana se han reducido de 7 a 8 veces más rápido durante la década de los noventa que en décadas anteriores (Combes *et al.*,2006).Como consecuencia, los márgenes proglaciares retroceden dejando espacios prístinos donde las plantas pueden establecerse. De este modo, los pisos bioclimáticos cambian de posición altitudinal y el superpáramo crece (Flórez, 2002) ya que las especies de plantas tienden a colonizar mayores altitudes (Spehn y Körner, 2010) en busca de un clima óptimo (Jump y Peñuelas, 2005).

Debido a la fitocolonización ascendente (Flórez, 2002) se espera que las poblaciones distribuidas en los límites altitudinales tiendan a expandirse, (Gottfried y Grabherr, 2003) produciendo una reducción concomitante en los tamaños de población y el aumento de la extinción de poblaciones que se encuentran en el borde del gradiente altitudinal (Jump y Peñuelas, 2005).

La tasa y los patrones de dicha dinámica son altamente dependientes de la geomorfología específica del corredor migracional, de la capacidad de dispersión de las especies, y de las estrategias desarrolladas para establecerse (Gottfried y Grabherr, 2003).

3.2. RASGOS FUNCIONALES DE VIDA: INDICADORES DE ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS A LO LARGO DE GRADIENTES ALTITUDINALES.

Los organismos presentes en el páramo se encuentran bien adaptados a las condiciones de estrés físico (Becker *et al.*, 2007). Por este motivo es necesario identificar el vínculo entre dichas adaptaciones y el medio ambiente, es decir el conjunto de atributos de la planta consistentemente asociados a las condiciones ambientales (Díaz *et al.*, 1998). Estos atributos en términos ecológicos suelen llamarse Rasgos funcionales de vida o “PFT” por sus siglas en inglés (Plant Functional Traits; e.g. Cornelissen *et al.*, 2003), y son necesarios para comprender la historia natural y las ventajas adaptativas de las organismos capaces de colonizar gradientes altitudinales (Díaz *et al.*, 1998).

De esta manera, los gradientes altitudinales ofrecen condiciones únicas para realizar pruebas de adaptación y de respuesta evolutiva de los organismos (Spehn y Körner, 2010) y han sido frecuentemente mencionados como modelos experimentales para la realización de ensayos y observaciones de campo (Becker *et al.*, 2007).

Para poder escoger los grupos de rasgos de vida, es necesario identificar los principales retos que tienen que enfrentar las plantas en el medio ambiente: dispersión, establecimiento y persistencia (Weiher *et al.*, 1999); tomando en cuenta las ventajas y desventajas que

presentan los distintos rasgos de vida de las plantas, los cuales representan un costo en fitness cuando el organismo gana un beneficio. Dichas compensaciones proveen la clave para entender la evolución de las estrategias de adaptación y la historia de vida de las especies (Yang *et al.*, 2008). De esta manera ciertos rasgos como SLA (ver sección 4.4.2) y la concentración de nitrógeno foliar pueden ser indicadores de la actividad fotosintética y de acumulación de biomasa (Lavorel *et al.*, 2002; Poorter *et al.*, 2009).

Por esta razón, las plantas que tienen amplios rangos altitudinales de distribución pueden presentar una gran variación en sus rasgos morfológicos (Cordel *et al.*, 1997), dicha variación en los rasgos funcionales está determinada por dos factores: La herencia genética (genotipo) y por la capacidad de responder a cambios en el ambiente a partir de un genotipo único (plasticidad fenotípica) (Royer *et al.*, 2009).

La plasticidad fenotípica es el factor al cual generalmente se le atribuye la heterogeneidad de rasgos (Schlichting, 1986). Es particularmente importante en plantas debido a su forma de vida sésil (Schlichting, 1986), y a que son capaces de producir réplicas de sus genotipos y crecer en diversos hábitats (Sultan, 2003). Las evidencias de la plasticidad fenotípica son objeto frecuente de estudio, ya que son fundamentales en el desempeño ecológico de las especies, e influyen el éxito de los organismos en su contexto natural, permitiendo que genotipos individuales puedan reproducirse y crecer exitosamente en diferentes ambientes (Sultan, 2003)

3.3. INTERACCIONES ENTRE PLANTAS Y VARIACIONES GENÉTICAS PUEDEN INFLUIR SOBRE LAS ESTRATEGIAS DE LAS PLANTAS

La plasticidad ambiental con respecto al estímulo abiótico del medio ambiente tiene importantes consecuencias sobre las interacciones entre plantas, hasta el punto de causar cambios en la competencia hacia interacciones positivas como la facilitación (Callaway *et al.*, 2002). Existe evidencia de que la severidad climática de los páramos tiende a incrementar el potencial y la fuerza de la facilitación, lo cual tiene un efecto en el balance entre interacciones positivas y negativas (Brooker, *et al.*, 2008). Por este motivo, es necesario conocer los efectos simultáneos de los mecanismos competitivos y de facilitación para poder entender el cambio de roles de los mismos (Callaway, 2007). Un concepto importante para entender el balance entre interacciones positivas y negativas es la hipótesis del gradiente de estrés (SGH por sus siglas en inglés), la cual predice que la frecuencia relativa de facilitación y competencia varía inversamente a través de los diferentes gradientes de estrés físico de los ecosistemas (Bertness y Callaway 1994). Bajo dichas premisas, se esperaría que la facilitación fuese común en comunidades que se desarrollan dentro de altos niveles de estrés ambiental (Maestre *et al.*, 2009).

Dado que las plantas muestran un alto grado de plasticidad en respuesta a los vecinos, e incluso a la identidad específica de los vecinos, la plasticidad fenotípica puede permitir a las especies adaptarse a la composición de sus comunidades, promover la convivencia y la diversidad de la comunidad (Callaway *et al.*, 2002).

Como se dijo anteriormente la variación en los rasgos funcionales de vida puede estar determinada también por la herencia genética (genotipo) (Cordell *et al.*, 1997; Royer *et al.*, 2009).

De esta forma, en ambientes de estrés físico alto como los alpinos, la selección natural es capaz de filtrar dentro de los genotipos a las características que no representen beneficio en cuanto al fitness de la planta, así ciertos rasgos funcionales de vida están ligados a cambios genómicos heredables (Körner, 2003). Esto sucede generalmente en sitios donde los recursos nutricionales son pobres, de este modo especies distribuidas en gradientes de riqueza-pobreza edáfica pueden diferenciarse intraespecíficamente y formar ecotipos (organismos de una misma especie que presentan diferencias genotípicas y fenotípicas como resultado de habitar un ambiente particular o un ecosistema definido) (Cordell *et al.*, 1997).

Así, la presencia de ecotipos está estrechamente ligada a la vida en las altas montañas (Körner, 2003). Podemos encontrar variabilidad genética incluso dentro de poblaciones que ocupan estrechos gradientes altitudinales, o entre poblaciones separadas por cortas distancias, pero que experimentan variación en cuanto a microhábitats, produciéndose una diferenciación microgeográfica (Jump y Peñuelas, 2005; Linhart y Grant, 1996).

De esta manera, el potencial adaptativo de las plantas alpinas depende de la diferenciación adaptativa a lo largo del gradiente altitudinal, y de la migración de genes que permita que los genomas localmente adaptados puedan mantenerse a pesar de la fuerte selección natural actuando sobre ellos (Gonzalo-Turpin y Hazard, 2009; Biars *et al.*, 2007).

Por este motivo el ensamblaje del genotipo de las plantas puede ser interpretado como el producto de: a) el efecto de filtración de características genéticas o alelos por parte de las condiciones climáticas, b) el régimen de disturbancia y c) las interacciones bióticas (Díaz *et al.*, 1999).

En este contexto la caracterización del potencial adaptativo de las plantas de alta montaña sobre un gradiente altitudinal es crucial para evaluar la vulnerabilidad de las especies vegetales a los cambios climáticos (Gonzalo –Turpin y Hazard, 2009 , Royer *et al.*, 2009).

3.4. OBJETIVOS:

3.4.1. OBJETIVO GENERAL:

Describir los mecanismos de colonización altitudinal de *Lasiocephalus ovatus* en el superpáramo del volcán Antisana.

3.4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Evaluar las variaciones y las ventajas adaptativas de los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente altitudinal.

Evaluar si el mecanismo de la facilitación ayuda la colonización de los pisos altitudinales superiores del gradiente altitudinal (Hipótesis del Gradiente de Estrés).

Evaluar los efectos del gradiente altitudinal sobre la estructura genética de *Lasiocephalus ovatus*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en el superpáramo de la Reserva Ecológica Antisana. Perteneciente al ramal oriental de la cordillera andina ecuatoriana.

El superpáramo es un ecosistema aislado, ubicado en las pendientes de la montañas más altas de los andes ecuatoriales entre los 4200 y 4800 metros sobre el nivel del mar. Es la zona con menor perturbación antropogénica, con condiciones climáticas semejantes a las tundras árticas, (Luteyn, 1999 y Medina y Mena,2001). Constituyen la parte superior del páramo, su límite superior son glaciares o nieves perpetuas (Luteyn, 1999)

Se caracteriza por poseer áreas fragmentadas, las cuales están pobladas mayormente de hierbas en roseta, subarbustos enanos y rastreros y pequeñas hierbas erectas (Sklenář y Balslev, 2005; Sklenář y Balslev, 2007). La vegetación de esta zona es capaz de resistir condiciones extremas de irradiación solar frío y constantes nevadas (Luteyn, 1999).

En los superpáramos ecuatorianos se encuentran alrededor de 388 especies de plantas vasculares que pertenecientes a 146 géneros y 52 familias, los que los convierte en los superpáramo de mayor riqueza en especies florísticas, en comparación con Venezuela y Colombia (Sklenář y Balslev, 2005). Las familias con mayor riqueza específica es Asteraceae con 83 especies y Poaceae con 49 especies. Los superpáramos están dominados por familias mayormente herbáceas como Cyperaceae, Brassicaceae, Caryophyllaceae y Valerianaceae; mientras que, otras familias dominantes del subpáramo (parte baja del

paramo) y del páramo de pajonal (paramo de altitud intermedia) como Melastomataceae, Ericaceae, y Solanaceae, poseen pocas especies o están ausentes en el superpáramo (Sklenář y Balslev, 2005) .

En el superpáramo se pueden distinguir dos niveles o franjas: la inferior que llega hasta los 4500 m de altitud, y la superior que está sobre dicha altitud (Sklenar *et al.*,2008). Las comunidades vegetales de los superpáramo ecuatorianos bajo los 4500 m de altitud están dominadas por arbustos esclerófilos como *Chuquiraga Jussieu*, *Diplostephium* spp., *Loricaria* spp., *Pentacalia* spp.; por almohadillas o plantas en forma de cojín como *Plantago rigida* *Werneria* spp., *Xenophyllum* spp. y *Azorella* spp.; por hierbas acaulescentes *Hypochaeris* spp., *Oritrophium* spp.; y por hierbas cespitosas *Calamagrostis* spp., *Festuca* spp. (Sklenar, 1999; Sklenar *et al.*,2008).

Desde los 4500 m de altura hasta el nivel de la nieve que limita superiormente a los superpáramos, la vegetación tiende a volverse escasa con un limitado número de especies. Los géneros más típicos dentro de este rango altitudinal son *Lasiocephalus*, *Draba*, *Notrotriche*, y *Gentianella*, dentro de los cuales algunas especies han tenido una evolución autóctona (Sklenar, 1999).

En Ecuador, los superpáramos están particularmente bien representados y se los encuentra aislados, en aproximadamente 25 montañas tanto en la Cordillera Occidental como en la Oriental, en un tramo de alrededor de 450 km desde la frontera colombiana en el norte hasta la provincia del Azuay en el Sur (Sklenar y Baslev, 2005).

Dependiendo de las condiciones climáticas locales, y de la orientación de la respectiva estribación con respecto a los vientos alisios (Sklenar y Baslev, 2005), los superpáramos pueden clasificarse dentro de tres categorías: húmedos muy húmedos y secos (Sklenar y Baslev, 2007).

El superpáramo presenta una amplia variación en temperatura durante el ciclo diario, observándose desde la congelación al sobre-calentamiento, debido a la elevada intensidad de radiación sobre todo del espectro ultravioleta. Dicha variación es más drástica que las variaciones de temperatura estacional, sin embargo la pluviosidad está fuertemente relacionada a la estacionalidad. La amplitud diaria de la temperatura es más marcada durante los períodos secos del año (Sklenar, 1999; Ricardi *et al.*, 1997).

En los Andes ecuatorianos la precipitación presenta un patrón bimodal, siendo sus valores máximos los períodos de marzo a mayo y de septiembre a noviembre (el patrón puede variar según la localidad), sin embargo en el superpáramo las precipitaciones pueden estar presentes durante todo el año (Sklenar, 1999). Durante la estación húmeda las nevadas son comunes (Sklenar, 1999). En la estación seca ocurren heladas nocturnas, que se manifiestan a través de escarcha, produciéndose un proceso continuo de congelamiento y derretimiento en las capas superiores del suelo a causa de fenómenos periglaciales (Sklenar, 1999; Ricardi *et al.*, 1997). A diferencia de los ecosistemas alpinos templados no existe cobertura de nieve persistente durante la estación fría (Körner, 2003).

4.2 SECTOR DE ESTUDIO: RESERVA ECOLÓGICA ANTISANA (REA)

La Reserva Ecológica Antisana (figura 1) se encuentra localizada a 50 km al sureste de Quito, en la provincia de Napo. Su ecosistema paramuno genera agua potable para 600 mil habitantes de los barrios del sur de Quito y energía eléctrica para 100 mil personas, a través del proyecto La Mica-Quito Sur (Freile y Santander, 2005 en ECOLAP Y MAE, 2007).

Debe su nombre al volcán Antisana (5 758 m.) que se ubica en la Cordillera Oriental de los Andes a 0° 30' de latitud Sur donde la cadena volcánica es más amplia (ECOLAP y MAE, 2007; Bourdon *et al.*, 2002). La base es de alrededor de 14 km de diámetro abriéndose de norte a sur (Sklenář & Lægaard, 2003). Permanece aún activo y aunque mucha de su historia eruptiva es desconocida el último registro de actividad ocurrió a inicios del siglo XIX (Bourdon *et al.*, 2002; Sklenář y Lægaard, 2003)

El Antisana como la mayoría de grandes cumbres de la cordillera oriental fue formado durante el Periodo Cuaternario, sobre formaciones de granito del Mesozoico, sin embargo esto se realizó durante dos fases: cara noroccidental, y cara suroriental (Bourdon *et al.*, 2002).

En la cara occidental se pueden observar mesetas sobre los 4000 metros de altura, en las cuales existe vegetación de páramo pajonal, con especies como *Calamagrostis intermedia*, *Festuca* spp. (Poaceae). Sin embargo conforme aumenta la altitud los penachos de hierbas son reemplazados subarbustos rastreros como *Baccharis caespitosa* y *Lupinus microphyllus*, plantas en roseta como *Valeriana rigida*, *Werneria nubigena*, *Uncinia macrolepis*, y en las áreas con más humedad se puede observar una dominancia de plantas con forma de almohadilla como *Azorella aretioides* y a mayor altitud *Xenophyllum rigidum*

(Sklenář y Lægaard, 2003; Sklenář y Balslev, 2005; Sierra, 1999 en ECOLAP Y MAE, 2007).

Por sobre los 4700 metros de altitud la vegetación está dominada por líquenes y musgos, disminuyendo notablemente la cantidad de angiospermas (Sierra, 1999 en ECOLAP y MAE, 2007), con pocas especies como *Lasiocephalus ovatus* o *Senecio nivalis* (Sklenář & Lægaard, 2003), las raíces y rizomas son muy desarrolladas y las hojas tienden a ser muy pequeñas (Sierra, 1999 en ECOLAP y MAE, 2007), el suelo de esta formación se encuentra cubierto por una capa de permafrost, donde pueden sobrevivir únicamente las plantas más resistentes al frío, a la desecación fisiológica y al viento (Mena y Medina 2001, cit. por Mogollón y Guevara 2004 en ECOLAP y MAE, 2007).

En el lado occidental del Antisana se presenta una vasta extensión de superpáramo (29 km²) siendo ésta la cuarta en área, superada por los superpáramo del Cotopaxi, Chimborazo y Cayambe (Sklenář y Balslev, 2005), sin embargo posee una gran cantidad de especies (140) superando en número de especies al de la cara occidental del superpáramo del Chimborazo (Sklenář y Lægaard, 2003).

4.3. ESPECIE DE ESTUDIO

Se eligió como modelo de estudio a *Lasiocephalus ovatus* (anexo 1) debido a los siguientes motivos:

- 1) Es una especie conspicua (de fácil taxonomía) de los superpáramos de Colombia y Ecuador (Luteyn, 1999). *Lasiocephalus ovatus* en Ecuador se encuentra en casi todos los superpáramos, su distribución va desde el Volcán Chiles en la frontera

colombiana hasta la región del Cajas en el sur (Sklenar, 2001), se distribuye hasta los 4800 m.

- 2) Es un género ampliamente distribuido dentro del gradiente altitudinal. *Lasiocephalus* es un género neotropical de los altos Andes consta de 15 a 20 especies desde Venezuela hasta Bolivia (Sklenar *et al.*, 2005 ; Dušková *et al.*, 2010).

El género presenta dos tipos diferentes de crecimiento: uno de forma trepadora y hojas anchas ligeramente leñoso en la base del tallo presente en el límite del superior del bosque montano y otro de plantas herbáceas erectas de hojas estrechas con hábito arbustivo presentes en el páramo de altura (Cuatrecasas 1978 en Dušková *et al.*, 2010). *L. otophorus* es un ejemplo del clado montano alto, mientras que *Lasiocephalus ovatus* pertenece al clado de páramo.

Además, es parte de la familia más representativa del superpáramo ecuatoriano (Asteraceae) en cuanto a riqueza de especies, pertenece a su vez a la tribu Senecioneae, una de las tribus que contribuyen de mayor manera a la diversidad de dicha familia en los altos Andes (Sklenar, 2001) en el páramo la tribu está representada por algunos géneros importantes como *Senecio*, *Pentacalia* y *Lasiocephalus* (Sklenar, 2001).

- 3) El género *Lasiocephalus* un buen candidato para el estudio de las respuestas evolutivas asociadas a la radiación adaptativa (Dušková *et al.*, 2010). Por ejemplo, dentro del género *Lasiocephalus* el clado de alta montaña (al cual pertenece la especie *Lasiocephalus ovatus*) está compuesto de organismos poliploides (Dušková *et al.*, 2010). Este hecho puede ser evidencia del potencial adaptativo de

Lasiocephalus ovatus, ya que la poliploidía es considerada como una fuerza adaptativa muy común en el reino vegetal (Soltis *et al.*, 2009).

- 4) *Lasiocephalus ovatus* posee una amplia distribución ecológica dentro del superpáramo. Puede encontrarse en varios tipos de hábitats del Superpáramo, tales como afloramientos entre rocas, suelos arenosos y muy a menudo son encontrados colonizando la superficie de las plantas de almohadilla (Sklenar, 2001). El amplio rango altitudinal de *Lasiocephalus ovatus* podría reflejar el éxito de la planta como especie colonizadora.

Como conclusión, el amplio rango altitudinal dentro del género y la variedad de formas de crecimiento, hacen a *Lasiocephalus* un buen modelo de estudio en gradientes altitudinales.

4.4. DISEÑO OBSERVACIONAL:

4.4.1. GRADIENTE ALTITUDINAL

El gradiente altitudinal es una herramienta de experimentación natural para medir la respuesta ecológica y evolutiva de los organismos bióticos a las influencias geofísicas y ambientales (Körner, 2007; Malhi 2010). En este contexto, a fin de determinar el nivel de plasticidad fenotípica que permite a *Lasiocephalus ovatus* colonizar hábitats con estrés físico, se escogió un gradiente con rango altitudinal entre 4200 a 4800 metros sobre el nivel del mar ubicado sobre la cara occidental del volcán Antisana (entre la laguna de Santa Lucía y el Glaciar N° 15). Esta es un área relativamente seca (menos de 1000 mm anuales

de lluvia ; Anthelme *et al.*, aceptado) donde existe una población grande de *Azorella aretioides* (Hedberg, 1992 en MOBOT ; ECOLAP Y MAE, 2007)

El gradiente consistió de 5 niveles altitudinales:

4200 m ; 4400 m ; 4500 m ; 4700 m ; 4800 m. (figura 2).

Para referirse a cada nivel altitudinal generalmente se utilizará la palabra sitio antes de la altitud y se omitirá la abreviación correspondiente a metros. Por ejemplo: sitio 4200, sitio 4400, etc.

Dentro de cada nivel altitudinal (n=5) se eligieron al azar 15 individuos de *Lasiocephalus ovatus*, a fin de realizar las observaciones morfológicas y moleculares que se describirán posteriormente.

4.4.1.1. Condiciones microclimáticas del gradiente altitudinal

Para describir las condiciones que pudieran influenciar los rasgos de vida de las especies presentes en el gradiente altitudinal se colocaron data loggers a cada nivel altitudinal (excepto en el sitio 4200).

Las mediciones incluyeron:

- Velocidad del viento (S-WSA-M003, Onset Computer Corporation, Pocasset, MA).
- Temperatura y humedad relativa en la zona de la hoja, es decir, 10 cm por encima de la superficie del suelo (inicio HOBO Pro-RH).

- Temperatura y humedad relativa en la zona de la raíz, es decir, 5 cm por debajo de la superficie del suelo (a través de tres y dos repeticiones espaciales, respectivamente; micro estaciones HOBO).

4.4.1.2 Nutrientes edáficos a lo largo del gradiente

Se escogieron 10 muestras de suelo subyacentes a los 15 individuos de *Lasiocephalus ovatus* elegidos para realizar las mediciones ecológicas y genéticas.

Esas muestras de suelo fueron enviadas a analizar a los laboratorios del INIAP a fin de obtener valores de micro y macronutrientes de cada nivel altitudinal del gradiente de estrés.

Para la extracción de nutrientes del suelo se utilizó el método Extractante Olsen modificado en el cual se reemplaza la selectividad de la raíz de este modo se tiene una estimado de los nutrientes que están disponibles para la planta (Hunter, 1978) (anexo 2).

Para analizar si existen diferencias en la composición de nutrientes a lo largo del gradiente de estrés se realizaron ANOVAS de una vía entre todos los niveles altitudinales para los nutrientes más importantes. Fue posible utilizar ANOVAS porque los datos siguen una ley Normal y variancias entre tratamientos fueron comprobadas iguales por el test Anderson-Darling. Para comparar cada nivel altitudinal se utilizó la prueba Post-hoc de Tukey. Para analizar dichas variaciones se utilizó el software estadístico Minitab15 (State College, USA).

4.4.1.3. Cobertura vegetal

Con el propósito de observar el efecto del gradiente altitudinal sobre la cobertura vegetal y el posible efecto de la cobertura vegetal sobre los rasgos de vida, se midió el nivel de cobertura vegetal en un radio de 38 cm a la redonda de los individuos seleccionados de *Lasiocephalus* en los 5 niveles altitudinales (anexo 3).

4.4.2. RASGOS FUNCIONALES DE VIDA

De los 15 individuos en cada altitud se midieron rasgos de vida de tipo vegetativo. Para realizar las respectivas mediciones se escogió al ramet (individuo aparentemente independiente que comparte el sistema radical con otros individuos aparentemente independientes) más alto de cada individuo.

Cada individuo de este tratamiento fue marcado con punto GPS, y con tubos PBS (anexo 4).

Los rasgos de vida fueron los siguientes:

- Altura del ramet: se midió la altura en centímetros desde el suelo hasta la última porción del tallo sin tomar en cuenta la flor terminal.
- Porcentaje de mortalidad: Se midió la porción del tallo que presenta hojas muertas desde el suelo (tomando en cuenta que las hojas nacen desde la primera porción del tallo, es decir ocupan toda la región aérea de la planta) hasta las primeras hojas

vivas. Después se calculó en porcentaje cuanto equivale la porción medida con respecto a la longitud total de la planta.

- Área de las hojas: Se eligieron 10 hojas al azar de cada individuo, las hojas en estado fresco fueron fotografiadas. El área de las mismas se calculó utilizando el software ImageJ. (anexo 5)
- Peso de las hojas: las diez hojas elegidas anteriormente se las secó en estufa a 60°C. posteriormente se las pesó utilizando una balanza analítica.
- Densidad de hojas: Se contó el número de hojas presentes en 10 cm de tallo. Se dividió el número obtenido para 10cm para tener un estimado de número de hojas por porción de tallo.
- Grosor de la hoja: calcular el grosor de la hoja no es sencillo debido a las diversas formas que pueden presentar las hojas, y al hecho de que generalmente las medidas de grosor son sumamente pequeñas (a veces menos de 100 μm) lo que hace muy difícil su estimación (Vile *et al.*, 2005).

Por este motivo el grosor se calculó por medio del Área específica de hoja (SLA por sus siglas en ingles) se deduce por la relación:

Área de la hoja / peso seco (Cornelissen *et al.*, 2003).

Mayores valores de SLA representarán hojas más delgadas y/o menos densas, y viceversa (Poorter *et al.*, 2009).

Se utilizaron los valores de área de las hojas y peso seco de las mismas calculados anteriormente para estimar el valor de SLA.

- Contenido foliar de nitrógeno, potasio y fósforo: Se envió a analizar la cantidad de nitrógeno foliar de todas las muestras. Los análisis se realizaron en los laboratorios del INIAP (anexo6).

A fin de analizar la posible variación en los rasgos de vida a través del gradiente altitudinal se utilizaró ANOVA de una vía. Para analizar dichas variaciones se utilizó el software estadístico Minitab15 (State College, USA). Para encontrar diferencias entre los diferentes pisos altitudinales se utilizaron pruebas post-hoc de Tukey. Fue posible utilizar ANOVAS porque los datos siguen una ley Normal y variancias entre tratamientos fueron comprobadas iguales por el test Anderson-Darling.

Las variaciones entre los rasgos fueron analizados con correlaciones de Pearson, regresiones lineales, y un test global con matriz de correlación: (ADE 4 package, R software).

4.4.3. EFECTOS DE LA PLANTA NODRIZA *AZORELLA ARETIOIDES*

Para comprobar si existe facilitación sobre *Lasiocephalus ovatus* se analizó el “Efecto de plantas nodrizas” de *Azorella aretioides* sobre *Lasiocephalus ovatus*.

Azorella aretioides, de la familia de los Apiaceae es una planta en forma de almohadilla (anexo7). En el Ecuador *Azorella* es un género de los altos Andes, nueve especies se encuentran en el páramo hasta los 4700metros de altura, las que presentan formas de cojín son: *Azorella aretioides*, *A. corymbosa*, *A. pedunculata* (Hedberg, 1992 en MOBOT).

Dentro del gradiente altitudinal elegido la población de *Azorella aretioides* se ubica desde los 4400 m. hasta los 4700 m. (páramo de almohadillas), sin embargo solo en dos niveles altitudinales (4500 m. y 4700 m.) se observa crecimiento de *Lasiocephalus ovatus* sobre los cojines de *A. aretioides*. Por este motivo los posibles efectos de *Azorella aretioides* sobre *Lasiocephalus ovatus* se evaluarán en estas dos altitudes.

4.4.3.1. Descripción de las condiciones edáficas generadas por *Azorella aretioides*

Con la finalidad de averiguar cuál es el efecto que genera *Azorella aretioides* sobre los suelos, se seleccionaron 10 almohadillas al azar sobre las cuales se observó crecimiento de *Lasiocephalus ovatus* (cabe aclarar que dichos individuos de *Lasiocephalus ovatus* fueron elegidos para realizar las mediciones que se describirán en la sección 4.4.2. Se colectaron muestras de suelo provenientes de las 10 almohadillas en ambas altitudes 4500 m. y 4700 m.

Esas muestras fueron comparadas posteriormente con las muestras de suelo de los individuos de *Lasiocephalus ovatus* elegidos anteriormente para la variable gradiente altitudinal. Usando el modelo lineal general anidado con la variable *Azorella* (al azar) anidada adentro de la variable altitud (fijada), se evaluaron las posibles diferencias significativas entre los suelos de *Azorella aretioides* y los suelos sin presencia de almohadillas para ambas altitudes (4500 y 4700 m.).

4.4.3.2. Rasgos de vida y *Azorella aretioides*

Se escogieron al azar 15 almohadillas, en las cuales se observó el crecimiento de *Lasiocephalus ovatus* en ambas altitudes (4500 m. y 4700 m.) a fin de realizar las mediciones de rasgos de vida que se describieron en la sección 4.4.2.

Se compararon los rasgos de vida de los individuos de *Lasiocephalus ovatus* que crecen sobre *Azorella aretioides* con los rasgos de vida de los individuos seleccionados previamente para la variable gradiente altitudinal (4500 m. y 4700 m.).

Dichas comparaciones fueron realizadas usando un modelo lineal general anidado. Este análisis permitirá evaluar si existen diferencias significativas en los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* que crecen sobre *Azorella aretioides*, con los individuos que crecen en el suelo desnudo, comparando además dos altitudes 4500 y 4700 m.

Para analizar los datos de la variable *Azorella aretioides* se utilizó el software estadístico Minitab15 (State College, USA).

4.4.4. ANÁLISIS GENÉTICOS

Para realizar los análisis genéticos se tomaron muestras de tallo y hojas de 10 individuos al azar pertenecientes a los individuos que fueron seleccionados para la medición de los rasgos de vida dentro del gradiente altitudinal.

Se extrajo ADN nuclear de los individuos seleccionados utilizando el Kit de Extracción vegetal de Invitrogen Easy-DNA™ Kit.

4.4.4.1. Marcaje molecular

Se observaron las posibles variaciones genotípicas de las poblacionales del gradiente altitudinal. Dichas variaciones fueron identificadas usando secuencias cortas de repetición en tándem (SSR por sus siglas en inglés), conocidos generalmente como microsatélites. Debido al alto polimorfismo en la repetición de dichas secuencias y a la alto grado de conservación entre especies relacionadas (Do Santos, *et al.*, 2007) es posible determinar diferencias observando patrones de heterocigocidad y homocigocidad entre las diferentes poblaciones (Watson *et al.*, 2007).

Debido a que no se cuenta con primers propios de la especie *Lasiocephalus ovatus*, se estandarizaron protocolos a fin de transferir primers del género cercano *Senecio* a nuestra especie. Los géneros *Lasiocephalus* y *Senecio* pertenecen a una misma tribu, Senecioneae (Persel, *et al.*, 2002 y Persel,. Además Persel *et al.*, (2007) después de estudios filogenéticos de la tribu sugiere que las especies de *Lasiocephalus* sean transferidas al género *Senecio*.

Los primers fueron diseñados por Liu *et al.*,(2004) a partir de librerías genómicas de las especies *Senecio vulgaris* y *Senecio squalidus*. Se eligieron 18 de un total de 35 primers diseñados por Liu *et al.*,(2002), 12 de los cuales fueron sugeridos por Richard Abbot (com.pers) coautor del aislamiento y caracterización de los primers, debido a que su transferencia a otras especies fue exitosa.

De los 18 primers escogidos se obtuvo señal luego de la amplificación de 8 primers. Seis de los cuales pudieron ser transferidos correctamente a *Lasiocephalus ovatus*, de entre estos, 4 fueron parte de la sugerencia de Abbot (com.pers) (tabla 1).

Para la transferencia de los primers y a fin e estandarizar el protocolo se empezó con el protocolo sugerido por (Liu *et al.*, 2002), y posteriormente se variaron las condiciones del coctel de PCR y (tabla 2) y del programa de amplificación.

4.4.4.2. Análisis de los datos

4.4.4.2.1 Programa estadístico

Muchos estudios genético poblacionales se han centrado exclusivamente en especies diploides, debido a la dificultad del análisis con marcadores codominantes como los microsatélites, lo cual constituye un desafío para identificar genotipos a partir de heterocigotos parciales (Van Puyvelde, *et al.*, 2010).

En especies tetraploides por ejemplo, un genotipo ABBC luego del análisis con microsatélites produciría por ejemplo un resultado ABC (heterocigoto parcial), para dicho resultado no se tendría la certeza de diferenciar AABC, ABBC o ABCC (Van Puyvelde, *et al.*, 2010). Esto sucede ya que, la reacción en cadena de la polimerasa en la cual se amplifican los microsatélites es una amplificación exponencial, no cuantitativa, basada únicamente en intensidad de bandas y picos de pesos moleculares. Por ende esta prueba no es fiable para determinar la copia del número de alelos polimórficos en un locus (Markwith, *et al.*, 2006).

Debido a que *Lasiocephalus ovatus* es una especie poliploide, y a que en muchos casos plantas triploides habitan en simpatría con plantas más abundantes de genoma diploide

(Duskova, *et al.*, 2010), se eligió el programa de análisis genético Polysat, un paquete del software estadístico R, el cual provee una herramienta útil para trabajar con datos de microsatélites a cualquier nivel de ploidía, incluyendo poblaciones con ploidías mezcladas (Clark y Jasienukk, 2011)

Debido a la versatilidad del entorno de programación de R y a la simplicidad de cómo los genotipos son almacenados por Polysat, el usuario puede encontrar muchas ventajas en el uso del software tales como PCAs o AMOVAs (Clark y Jasienukk, 2011).

El programa puede calcular distancias genéticas entre individuos, fijar la ploidía basándose en el número de alelos (si existe ambigüedad en el número cromosómico) y estimar frecuencias alélicas e índices de fijación F_{ST} (Clark y Jasienukk, 2011).

4.4.4.2 Distancias genética entre individuos

Esta función calcula la distancia entre dos individuos en cada loci basada en Bruvo *et al.* (2004).

Dado que el número de copias de alelos es frecuentemente ignorada en los datos de microsatélites para organismos poliploides, Bruvo *et al.*,(2004) desarrolló una medida de distancia genética basada en los índices de bandas compartidas, pero teniendo en cuenta las distancias mutacionales entre los alelos (Clark y Jasienuk, 2011).

El índice de distancia genética de bandas compartidas se define generalmente como la fracción de bandas o fragmentos en común de dos individuos dividido para el número

promedio de fragmentos exhibidos en ambos individuos (Lynch, 1990). De este modo se genera una matriz pareada de todos los individuos que componen la muestra. Esta matriz contiene todas las diferencias en el número de repeticiones entre los alelos de dos individuos en un locus (Clark y Jasienuk, 2011).

Estas diferencias son entonces geoméricamente transformadas para reflejar las probabilidades de mutación de un alelo a otro (Clark y Jasienuk, 2011; Bruvo *et al.*, 2004). Debido a que no se conoce si las diferencias en ploidía se produjeron debido a una adición o a una pérdida alélica en el genoma, cuando un individuo tiene más alelos que otro, se establecen rangos de valores entre 0 y 1. Así valores de 0 indicando genotipos idénticos, y 1 es una distancia máxima teórica, si todos los alelos del genotipo 1 diferían en un número infinito de repeticiones de todos los alelos en el genotipo 2 (Clark y Jasienuk, 2011; Bruvo, *et al.*, 2004).

Utilizando las distancias interindividuales generadas anteriormente R , genera un componente de coordenadas principales PCA, mostrado gráficamente a los individuos de la muestra, donde el componente de coordenada principal representa la cantidad máxima de variación de las distancias entre los individuos, que se puede representar en un eje. El segundo componente de coordenada principal toma la variación restante y la representa tanto como sea posible (Clark y Jasienuk, 2011).

4.4.4.2.3. Frecuencias alélicas

Para el cálculo de las frecuencias alélicas, Polysat asume que en un genotipo parcialmente heterocigoto todos los alelos tienen la misma posibilidad de estar presentes en más de una copia (Clark y Jasienuk, 2011).

En el caso de la poliploidía, cada alelo de un heterocigoto parcial se cuenta tal como se presente, es decir en una fracción de una copia. Biológicamente esto es algo ambiguo ya que no se conoce con certeza cuantas copias de un alelo están presentes en los heterocigotos parciales (ver sección 4.4.4.2.1.). Sin embargo, si se piensa que un alelo se anotó por error, este método le da a cada alelo la misma oportunidad de ser un alelo errado (Clark y Jasienuk, 2011).

4.4.4.2.4 Índice de Fijación

A partir de las frecuencias alélicas Polysat calcula diferenciación entre poblaciones produciendo una matriz pareada de todas las poblaciones que componen la muestra, generando índices de fijación F_{st} (Clark y Jasienuk, 2011).

F_{st} es la medida de endogamia debido a la correlación entre los alelos que se encuentran en la misma subpoblación (Clark y Jasienuk, 2011).

Se realizó un test de Mantel v 1.19 (Cavalcanti, 2008) con el fin de determinar si las distancias genéticas F_{st} entre los niveles altitudinales del gradiente son influenciadas por las distancias geográficas o por factores abióticos tales como las variables microclimáticas

o los nutrientes del suelo. Se utilizó el software estadístico R para crear matrices de distancias geográficas, distancias microclimáticas y distancias de nutrientes del suelo entre cada población. Dichas matrices fueron correlacionadas posteriormente con la matriz F_{st} por medio de un Test de Mantel. Las distancias geográficas, microambientales y de nutrientes del suelo (tablas 6 y 7 y 8) se crearon a partir de: 1) La ubicación geográfica en coordenadas de cada nivel altitudinal. 2) Los datos microclimáticos obtenidos con data loggers (ver sección 4.4.1.1) (tabla 3). 3) La media (por cada nivel altitudinal) de los principales nutrientes del suelo (Nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio).

4.4.4.2.5. Índice de heterocigidad esperada (diversidad genética)

Heterocigidad es de gran interés para los estudios de variación genética en poblaciones naturales (McDonald, 2008). La heterocigidad esperada se define como la fracción estimada de todos los individuos, que pueden ser heterocigotos para un locus elegido al azar. Generalmente es utilizada como una aproximación de la diversidad genética (McDonald, 2008). Difiere de la Heterocigidad observada ya que es una predicción basada en las frecuencias alélicas de una muestra de individuos .

Para calcular la Heterocigidad esperada para todos los loci se utilizó la siguiente fórmula:

$$1 - \frac{1}{m} \sum_{l=1}^m \sum_{i=1}^k p_i^2$$

(McDonald, 2008)

La fórmula representa la sumatoria de la sumatoria de las frecuencias alélicas al cuadrado de k alelos cuando hay m loci.

5. RESULTADOS

5.1. DESCRIPCIÓN DEL GRADIENTE ALTITUDINAL

5.1.1. Gradiente de estrés abiótico.

La temperatura del suelo a nivel de la raíz de *Lasiocephalus ovatus* estuvo correlacionada negativamente con la altitud. Es decir el aumento en el gradiente estrés tiene como resultado una concomitante reducción en la temperatura (tabla 3).

En cuanto a la humedad relativa a nivel de la raíz no se observó una tendencia lineal con respecto al gradiente altitudinal. Sin embargo, las pruebas post-hoc de Tukey demostraron que todos los pisos altitudinales presentaron diferencias significativas entre ellos para esta variable microclimática. Se observó que el sitio 4800 posee la mayor humedad relativa a nivel de la raíz de la planta (tabla 3).

La temperatura a nivel de la hoja de *Lasiocephalus ovatus* también mostró una disminución con respecto al gradiente altitudinal, todos los pisos altitudinales mostraron diferencias significativas con la post-hoc de Tukey (tabla 3). La humedad relativa a nivel de las hojas mostró variaciones significativas a lo largo del gradiente altitudinal, sin embargo estas variaciones no mostraron ningún patrón a lo largo del gradiente (tabla 3).

Para la velocidad del viento no se observó una tendencia con respecto al gradiente altitudinal. Sin embargo las pruebas post-hoc de Tukey demostraron que todos los pisos

altitudinales presentaron diferencias significativas entre ellos para la velocidad del viento. Se observó que el sitio 4800 está menos afectado por los vientos (tabla 3).

5.1.2 Nutrientes

Se detectó una disminución entre cada nutriente en relación al gradiente altitudinal. Sin embargo una gran parte de la variación entre los pisos altitudinales no parece lineal gráficamente. Por ejemplo en los sitios 4400 y 4500, los valores detectados fueron inusualmente bajos e inusualmente altos respectivamente (figura 3 y 4). Dichos patrones pueden depender de aspectos locales encontrados en cada sitio, sobre todo en los dos pisos altitudinales mencionados anteriormente.

5.1.3. Cobertura vegetal.

El patrón de porcentaje de cobertura vegetal a través del gradiente altitudinal fue muy similar al patrón registrado para los nutrientes de suelo a lo largo del gradiente altitudinal. La cobertura vegetal en el sitio de 4500 es inusualmente alta ($97\% \pm 1$ SE) y la cubierta vegetal en el lugar 4400 es inusualmente baja ($33\% \pm 9$ SE). (figura 5). De este modo la cobertura vegetal podría correlacionarse mejor que la altitud para explicar el patrón de los nutrientes del suelo (figura 6). Esto puede explicarse por trastornos locales. Por ejemplo la presencia de arroyos temporales en el sitio 4400 que generan canales y erosionan el suelo.

5.2. RASGOS FUNCIONALES DE VIDA Y GRADIENTE ALTITUDINAL

Con excepción de la mortalidad (Anova: $P > 0.05$) todos los rasgos de vida mostraron una variación significativa con el gradiente altitudinal (figuras 7, 8, 9 y 10). Sin embargo, sólo la densidad de hojas y la altura de la planta se correlacionaron linealmente con la elevación, mientras que los otros indicadores parecen develar relaciones más complejas.

El área específica de la hoja SLA (specific leaf area) mostró variaciones significativas para el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0.000$). Además tuvo una curva particular a lo largo del gradiente altitudinal en la cual los valores de SLA aumentaron hasta llegar a un máximo 4500 y 4700 m. para después presentar valores bajos para el sitio 4800. Por lo tanto los valores más bajos de SLA se ubicaron en los sitios 4200, 4400 y 4800 los cuales fueron significativamente diferentes de los sitios 4500 y 4700 que tuvieron los valores más altos del gradiente. No se obtuvieron diferencias significativas entre el sitio 4500 y el sitio 4700 (figura 6a).

El peso de las hojas también mostró variaciones significativas para el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0.000$), mostrando una disminución lineal en el gradiente hasta el sitio 4700. Posteriormente para el sitio 4800 se observó un aumento sustancial en el peso seco de las hojas. De este modo los valores de peso de las hojas del sitio 4800 fueron significativamente superiores a los valores de peso seco de las hojas del sitio 4700 (figura 6b).

Al igual que el peso seco de las hojas el área de las hojas sufrió una disminución lineal al aumentar el gradiente altitudinal (figura 7a). En el sitio 4800 los valores del área de las hojas aumentaron y fueron significativamente superiores a los valores del sitio 4700.

La variación del área foliar fue significativa en el gradiente altitudinal (Anova: $P < 0.01$).

La altura de la planta disminuyó mientras el gradiente altitudinal aumentaba, sin embargo a partir del sitio 4500 se observó un estancamiento con un ligero aumento en la altura de las plantas al final del gradiente, pero este aumento no fue significativo. El único piso altitudinal que fue significativo en comparación con los anteriores fue el sitio 4200 (figura 7b). La variación de la altura de la planta fue significativa en el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0.000$).

Como se dijo anteriormente la densidad de hojas por longitud de tallo se vio incrementada linealmente al aumentar el gradiente altitudinal. No se observaron diferencias significativas entre los sitios 4200 y 4400, sin embargo la densidad de hojas por longitud de tallo de ambos sitios fue significativamente inferior a la densidad de hojas por longitud de tallo de los sitios 4700 y 4800 (figura 8a). La variación de la densidad de hojas por longitud de tallo fue significativa en el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0.000$).

El nitrógeno foliar tuvo una variación significativa para el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0.00$). La cantidad de nitrógeno foliar disminuyó mientras el gradiente altitudinal aumentaba hasta el sitio 4500. A partir de ese piso altitudinal la cantidad de nitrógeno foliar mostró un estancamiento con un ligero incremento al final del gradiente altitudinal sin que este incremento fuera significativo (figura 8b).

La cantidad de fósforo foliar tuvo una variación significativa para el gradiente altitudinal (Anova: $P = 0,03$). Al igual que la cantidad de nitrógeno la cantidad de fósforo foliar sufrió una disminución al aumentar el gradiente altitudinal, sin embargo esta disminución ocurrió hasta el sitio 4700, para el final del gradiente la concentración de fósforo foliar aumentó notablemente, sin embargo este incremento no fue significativo en comparación con el sitio 4700 (figura 9a).

La cantidad de potasio varió significativamente a través del gradiente altitudinal, sin embargo no se observó ningún patrón (Anova: $P=0,001$; figura 9b).

El análisis de componentes principales nos muestra de manera sintética en cuales direcciones van los diferentes rasgos de vida; y permite detectar cuáles son los que van en la misma dirección y los que son antagonistas (figura 11). Podemos observar que existe una relación inversa entre SLA y la altura de las plantas y la cantidad de nitrógeno foliar. El peso y el área de las hojas variaron isométricamente a través del gradiente altitudinal, y también presentan una relación inversa aunque no tan marcada con SLA.

5.3. EFECTOS DE LA PLANTA NODRIZA *Azorella aretioides*.

El modelo lineal general muestra dos valores P de significancia. En el primero se relaciona solamente con la altitud (4500 m. y 4700 m.). El segundo valor, $P_{\text{altitud}_{(Azorella)}}$ (variable *Azorella* anidada en altitud) indica si *Azorella aretioides* influye en un nivel altitudinal específico. El valor obtenido de $P_{\text{altitud}_{(Azorella)}}$ es altamente significativo para algunos nutrientes del suelo y para algunos rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* que crecen sobre las almohadillas. Al observar los gráficos de intervalos de confianza de dichos

nutrientes del suelo y rasgos de vida, se constata que el efecto significativo de *Azorella aretioides* sobre el suelo y sobre los rasgos de vida ocurre en el sitio 4700.

Los nutrientes que fueron significativamente más abundantes ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} < 0.01$) en el sitio 4700 (al comparar suelos bajo *Azorella aretioides* con los suelos sin presencia de almohadillas) fueron los siguientes: Magnesio ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} < 0.001$; figura 12a), Potasio ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} < 0.001$; figura 12b). Además de los nutrientes mencionados anteriormente el suelo de *Azorella aretioides* presentó diferencias significativas en cuanto a materia orgánica en comparación con los suelos sin presencia de *Azorella aretioides* para el sitio 4700 ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} < 0.001$; figura 13).

En cuanto a los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus*, la altura, densidad de hojas por longitud de tallo, mortalidad y SLA no mostraron diferencias significativas para la variable *Azorella* anidada en altitud ni para la variable altitud según el modelo lineal general anidado.

El peso de las hojas no mostró diferencias significativas entre ambas altitudes donde está presente *Azorella* ($P = 0,266$), sin embargo se encontraron diferencias altamente significativas para la variable *Azorella* anidada en altitud ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} = 0,000$), sugiriendo un efecto positivo de *Azorella aretioides* sobre el peso de las hojas de *Lasiocephalus ovatus* para el sitio más alto (4700) (figura 14a).

Al igual que el peso de las hojas, el área foliar fue influenciada por *Azorella aretioides* en el sitio más alto del gradiente (4700) ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} = 0,001$), más no se encontraron diferencias significativas entre ambas altitudes (Anova: $P = 0,228$) (figura 14b).

El nitrógeno foliar fue otro rasgo de vida que mostró diferencias altamente significativas para la variable altitud vs *Azorella* ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} = 0,006$) (figura 15a).

La cantidad de magnesio foliar al igual que el nitrógeno mostró diferencias significativas para la variable altitud vs *Azorella* ($P_{\text{altitud}_{(Azorella)}} = 0,019$). Este rasgo de también vida mostró diferencias altamente significativas entre ambas altitudes (Anova: $P = 0,000$; figura 15b).

5.4. VARIACIÓN EN RASGOS GENOTÍPICOS A LO LARGO DEL GRADIENTE ALTITUDINAL

5.4.1 Heterocigosidad esperada.

El índice de heterocigosidad esperada (diversidad genética) presentó valores altos para todos los niveles altitudinales con un rango de valores de entre 0.70 y 0.76. Contrariamente a lo que se esperaría, el sitio 4200 que presenta menos rigor ambiental y una población más numerosa registró los valores más bajos de heterocigosidad esperada (0,706). (tabla 4)

La diversidad aumentó al incrementarse el gradiente altitudinal alcanzando un pico a la elevación intermedia de 4500m. (0,765). Debajo de este punto la diversidad genética decreció, se necesitan sitios intermedios para confirmar esta tendencia.

Para tener una idea más amplia de la estructura genética de los niveles altitudinales del gradiente, se realizó un conteo de alelos por cada microsatélite y en total de cada población (tabla 5). En dicho conteo se observó un patrón algo similar al del índice de diversidad genética (H_e). Es decir, el número de alelos totales (suma del número de alelos de los 6

loci) aumentó con el gradiente y posteriormente sufrió un leve descenso en el sitio 4800. Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido para el índice He, el número de alelos totales registró su valor máximo en el sitio 4700 y no en el sitio 4500.

5.4.2. Distancias genéticas:

El análisis de componentes principales muestra 2 componentes principales: El componente principal 1 explica el 20.723% de la variación total; el componente principal 2 explica el 15.890 % de la variación total. En conjunto los dos componentes explican el 36.614% de la variación total. (figura 16).

El PCA obtenido a partir de la medida de distancia de Bruvo, *et al.*, (2004) demostró una segregación de los individuos por la altitud, de este modo se identificó un patrón estructurado de distancia genética a lo largo del gradiente altitudinal. Esto se puede deducir al observar las distancias genéticas que al parecer se encuentran aumentando a lo largo del componente principal N°1 desde los individuos del sitio 4400 hasta los individuos del sitio 4700.

Los individuos de los sitios 4200 y 4400 se presentan más aislados de los otros sitios del gradiente.

Los individuos del sitio 4400 es el más separado de los sitios, agrupándose en la parte más alta del Componente principal de coordenadas N°1. Para el componente principal de coordenadas N° 2 esta población presentó un valor medio. Este agrupamiento de los

individuos sugiere que la subpoblación de *Lasiocephalus ovatus* que crece a 4400 m. comparte el menor número de alelos con las otras subpoblaciones del gradiente altitudinal.

La segunda subpoblación que presenta un grado de aislamiento de los otros individuos que componen la muestra es el sitio 4200 (límite inferior del gradiente).

En este caso los individuos tienen una distribución alta para el componente principal de coordenadas N°1 y una distribución muy baja para el principal de coordenadas N° 2.

El sitio 4500 presentó una distribución más amplia sobre el componente principal de coordenadas N°1. Así como una amplia distribución para el componente principal de coordenadas N° 2. Esto sugiere que los individuos de *Lasiocephalus ovatus* que crecen a 4500 m. comparten alelos con todas las subpoblaciones del gradiente altitudinal.

Los individuos de los sitios 4700 y 4800 se encuentran agrupados entre sí sin embargo los individuos de 4700 presentan una distribución más baja para el componente principal de coordenadas N°1 que los individuos del sitio 4800.

De todas maneras ambas subpoblaciones se encuentran agrupadas en la parte más baja del componente principal de coordenadas N°1, pero poseen una distribución media para el componente principal de coordenadas N° 2 similar a la distribución que presentan los individuos del sitio 4400.

5.4.3 Fst y Test de Mantel:

Los valores de Fst fueron registrados en una matriz de distancias entre poblaciones (tabla 6).

No se encontró una correlación significativa entre la matriz Fst y las matrices de distancias geográficas (tabla 7), microambientales (tabla 8) y edáficas (tabla 9). El test de matel que correlacionó los índices Fst con la matriz de distancias geográficas arrojó los siguiente resultados: $p=0.9984$; $R=0.715$. El test de matel que correlacionó los índices Fst con la matriz de distancias ambientales arrojó los siguientes resultados: $P=0.0544$; $R=-0.828$. El test de matel que correlacionó los índices Fst con la matriz de distancias edáficas arrojó los siguientes resultados: $P=0.0633$; $R=-0.498$.

6. DISCUSIÓN

6.1. VARIACIONES EN LOS RASGOS DE VIDA A TRAVÉS DEL GRADIENTE

Los rasgos de vida a lo largo del gradiente altitudinal mostraron plasticidad fenotípica, lo que puede explicar posibles adaptaciones ambientales en relación al gradiente de estrés, que a su vez pueden reflejar diferentes estrategias (Jian *et al.*, 2009; Halloy & Mark, 1998).

Por ejemplo SLA (estimado de grosor de las hojas) es considerado un poderoso indicador ecofisiológico característico de las plantas para la tolerancia al estrés (Scheepens *et al.*, 2010), está generalmente correlacionada positivamente con la temperatura del aire, siendo esta la principal razón por la cual SLA varía en los gradientes altitudinales (Poorter *et al.*, 2009).

En el presente estudio la SLA presentó un aumento a lo largo del gradiente altitudinal. Sin embargo, según algunos estudios realizados en gradientes altitudinales, la SLA se ha visto disminuida al incrementarse la altura, es decir que el grosor de la hoja se incrementa progresivamente con respecto al aumento en el gradiente altitudinal, esto puede deberse a que en un ambiente altamente estresado, es necesario invertir en hojas más gruesas que les permitan al individuo mantener el balance de costo de carbón asimilado ayudándole a subsistir en sitios de pobre estado nutricional, o de alto estrés físico (Cordell *et al.*, 1998; Cornelissen *et al.*, 2003; Diemer, 1998a; Diemer, 1998b).

De todas maneras, el aumento de SLA podría tener ventajas adaptativas para los *Lasiocephalus ovatus*. Esta tendencia puede ser explicada como una estrategia de la hoja para maximizar la eficiencia fotosintética (Gonzalo-Turpin y Hazard, 2009; Zhang *et al.*,

2004; Mediavilla *et al.*, 2001), debido a que hojas muy gruesas podrían presentar problemas potenciales por tres motivos principales:

El primero debido al efecto negativo de la presión parcial de CO₂ que podría reducir la actividad de la fotosíntesis a grandes altitudes (Körner 2003). En nuestra elevación de un gradiente altitudinal de 600 m de longitud se reducirá la presión de CO₂ en aproximadamente 6 o 7% , si se tiene en cuenta otros cambios como la variación de la presión parcial de oxígeno (Körner 2003). De este modo, una hoja más gruesa o más densa (baja SLA) puede presentar problemas con respecto al transporte de CO₂ de la atmósfera hacia la hoja (Zhang *et al.*, 2004). Una hoja muy gruesa presenta poca cantidad de espacios intercelulares que faciliten el intercambio gaseoso (Syvertsen *et al.*, 1995). De esta manera, a más de contar con presiones bajas de CO₂ provocadas por el aumento en la altitud (Rada *et al.*, 1998), una hoja gruesa puede presentar una ruta difusiva difícil que reduciría la concentración de CO₂, el cual es utilizado durante la carboxilación (fijación de carbono durante la ciclo de Calvin) (Zhang *et al.*, 2004; Milthorpe y Newton, 1963).

Una segunda desventaja que pueden presentar las hojas con valores bajos de SLA, es que éstas al ser más gruesas contienen una mayor cantidad de enzimas fotosintéticas, y por lo tanto tienen una mayor demanda para el dióxido de carbono por unidad de área (Li *et al.*, 2006), por lo tanto en un ambiente donde la presión parcial de CO₂ es baja (Sklenár *et al.*, 2005), es lógico pensar que una anatomía foliar que requiera más cantidad de dióxido de carbono no es eficiente.

Finalmente una hoja más gruesa al incrementarse la altitud puede presentar deficiencias fotosintéticas por motivos no estomáticos, relacionados con el nitrógeno foliar ya que en

hojas más gruesas es mucho más difícil distribuir el elemento a la maquinaria fotosintética (Mediavilla *et al.*, 2001).

La deficiente distribución de nitrógeno al tener una hoja más gruesa (menor SLA) (Mediavilla *et al.*, 2001) sumada al bajo suplemento del suelo (Diemer, 1998a; Macek *et al.*, 2009) y a la disminución de nitrógeno foliar al incrementar el gradiente (figura 9b) puede generar tasas fotosintéticas menores al incrementarse el grosor de la hoja.

No obstante, el contenido de nitrógeno por materia seca de la hoja por lo general está correlacionado positivamente con SLA, lo cual a su vez se relaciona linealmente con la actividad fotosintética de las plantas (Cordell, 1999; Choler, 2005; Milla *et al.*, 2009; Poorter *et al.*, 2009). Este no fue el caso de este estudio, no se encontró una correlación significativa entre SLA y nitrógeno foliar, sin embargo el análisis de componentes principales mostró que ambos rasgos de vida son antagonistas (figura 11). Esto puede explicarse debido a que esta relación generalmente es válida para especies deciduas, pero se carece de evidencia al considerar las especies de hojas perennes (Cordell, 1999 ; Takahashi y Miyajima, 2008). En ambientes alpino tropicales la mayoría de las especies perennes desarrolla rasgos de hojas perennes (Luteyn, 1999) este es el caso de *Lasiocephalus ovatus*.

En cuanto al cambio de patrón a 4800 (incremento en el tamaño de las hojas para este sitio en cuanto al grosor área y peso foliares ; figuras 6 y 7), dicha tendencia puede deberse a una rápida repartición de la biomasa, probablemente en respuesta a las variaciones en los recursos hídricos del suelo (Maherali y DeLucia, 2001) (la humedad relativa para el sitio 4800 es significativamente la mayor del gradiente). Así, la expansión foliar es

extremadamente sensible al estrés hídrico, por este motivo en sitios donde se mantiene la humedad relativa del suelo, la pérdida de agua provocada por la constante evapotranspiración de la planta se reduce (McGraw, 1985).

De este modo, al reducirse la pérdida de agua un incremento en el potencial hídrico de las hojas puede permitir una mayor expansión foliar (McGraw, 1985; Maherali y DeLucia, 2001; Krizek *et al.*, 2004). Además de una mejor captura de CO₂ hacia la biomasa aérea de las hojas (Krizek *et al.*, 2004).

Otro motivo por el cual la biomasa de las hojas se vio incrementada en el sitio 4800 podría ser una disminución en la sequedad fisiológica de las hojas. Debido a que en lugares con vientos de grandes velocidades como el Superpáramo (Sklenar, 2006) se producen turbulencias en la capa límite (Molina-Montenegro, 2008), y dada la alta radiación solar propia de las grandes altitudes se produce una apertura estomática, (Meizner y Goldstein, 1985) por lo que es natural que se pierda agua por transpiración (Molina-Montenegro, 2008). Esta pérdida de agua pudo ser menor en el sitio 4800 debido a la significativa reducción en la velocidad del viento para este sitio (tabla 3). Hecho que ocurre debido probablemente a que el sitio está dominado por rocas, que pueden disminuir la perturbación tanto de los vientos catabáticos (Kazanskii, 2010), como de los vientos provenientes del Noroeste desde la Laguna de Santa Lucía.

Ya que, en el sitio 4800 la velocidad del viento es significativamente la menor de todo el gradiente altitudinal, sus individuos están menos expuestos a la perturbación mecánica de la capa límite de las hojas, y sus posibles consecuencias sobre la pérdida de agua producida por la presión de vapor. Retuerto y Woodward, (1992) demostraron que la biomasa aérea de las plantas decreció significativamente en condiciones donde la velocidad del viento

aumentaba. Además, observaciones de campo realizadas en el mismo sitio de estudio sugieren que el viento tiene un efecto negativo sobre el fitness de la planta, precisamente debió a la sequedad fisiológica (Anthelme *et al.*, aceptado).

De esta manera, los rasgos de vida pueden ser influenciados por disponibilidad de agua o por perturbaciones físicas provocadas por las diferentes condiciones locales de los gradientes altitudinales (Jian *et al.*, 2009). además

Al mismo tiempo, el incremento en la biomasa de las hojas puede a su vez tener beneficios para la planta en cuanto a la resistencia al estrés térmico. Por ejemplo el peso de la hoja y SLA reflejan la cantidad de materia seca, esto es importante en zonas con condiciones de bajas temperaturas y alta irradiación solar (Körner, 1989), ya que se la relaciona con la rigidez y la capacidad de soportar estrés físico (Cornelissen *et al.*, 2003).

Además, se ha encontrado una relación directa entre el aumento del peso seco y la cantidad total de carbohidratos no estructurales de la hoja (carbohidratos que no forman parte de estructuras como la membrana celular) (Piper *et al.*, 2006; Castrillo y Simoes). Los carbohidratos además actúan como sustratos osmóticos activos que elongan las células de la hoja (Gupta y Kaur, 2000), esto podría explicar el aumento en el área foliar para el sitio 4800 (figura 8a) ; esto es consistente con las observaciones de Castrillo y Simoes, (1997), que en los Andes venezolanos encontró que en el límite superior del gradiente altitudinal la medida de carbohidratos no estructurales por cm^2 aumentó. Den Hertog *et al.*, (1998) y Roumet *et al.*,(1999) pudieron demostrar además que el aumento en los carbohidratos no estructurales ocasionó una reducción en SLA.

Dicho aumento de carbohidratos no estructurales podría constituir una adaptación en la cual la hoja está protegida contra de las heladas, dado que los carbohidratos pueden mejorar la tolerancia al frío (Bigras y Colombo, 2001), y jugar un papel importante en la tolerancia al congelamiento (Shahba et al., 2002; Castrillo y Simoes, 1997), ya que las hojas pueden utilizar los carbohidratos como por ejemplo la sucrosa, como un “crioprotector” que preserva a las células (Bigras y Colombo, 2001), debido a que los carbohidratos poseen una dinámica especial al interactuar con el agua intracelular descendiendo el punto de congelamiento y modifican las temperaturas de transición vítrea (formación de cristales que podrían lisar la célula) (Caffarena, 1996).

Por otra parte, no solo el tamaño y el grosor de las hojas pueden constituir una ventaja para la planta. Se ha observado que la presencia de hojas alrededor del tallo es capaz de proteger al mismo de las inclemencias del clima paramero como por ejemplo la sequedad fisiológica o el frío extremo (Smith, 1979). Un ejemplo de esto es la adaptación que presentan las especies de *Espeletia*, al no deshacerse de sus hojas muertas, para que el tallo permanezca cubierto y protegido (Smith, 1979).

Dado que el patrón de distribución de las hojas en *Lasiocephalus ovatus* es similar al patrón de distribución de las hojas de *Espeletia* sp. ,y que en el presente estudio se observó que la densidad por longitud de tallo aumento proporcionalmente con el gradiente altitudinal se esperaría que esta adaptación cumpla la misma función que en *Espeletia* sp.

Por este motivo, un tallo desnudo expuesto a las condiciones del páramo puede tener efectos letales en la planta, ya que a temperaturas bajo cero las células medulares no pueden recargarse de agua, también puede producirse embolias en el xilema del tallo, o el tejido

parenquimático puede sufrir daños por congelación (Goldstein y Meinzer, 2006). Esta estrategia es consistente con nuestros resultados, ya que la densidad de hojas por longitud de tallo fue el único rasgo de vida que tuvo un incremento lineal a través del gradiente altitudinal. (figura 9a).

6.2 EFECTO DE *Azorella aretioides* SOBRE LA COLONIZACIÓN DE *LASIOCEPHALUS OVATUS*

La relación globalmente significativa (sin tomar en cuenta la altitud) de *Azorella aretioides* sobre los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* demuestra la importancia de *Azorella aretioides* como una planta nodriza. Al considerar la altitud, esta relación es significativa para el sitio 4700 (límite superior altitudinal de *Azorella aretioides*) demostrando de esta manera la hipótesis del gradiente de estrés, en la cual el efecto facilitador de las plantas nodrizas está presente en el sitio del gradiente que represente más estrés para las plantas (Callaway, 2007; Brooker *et al.*, 2008). Dicho efecto se vió reflejado en la cantidad de Nitrógeno y magnesio foliar que fue mayor en las hojas de *Lasiocephalus ovatus* influenciadas por *Azorella aretioides* en el sitio 4700. Es conocido que ambos nutrientes son elementos importantes de la actividad fotosintética de la enzima Rubisco (Hermans *et al.*, 2004; Feller *et al.*, 2007). Por este motivo, mayores concentraciones de magnesio y nitrógeno foliar pueden ser ventajosas para individuos de *Lasiocephalus ovatus* facilitados por *Azorella aretioides*.

El magnesio por ejemplo es un catión importante, las plantas lo requieren para captar energía solar y para conducir las reacciones fotoquímicas (Hermans *et al.*, 2004) ya que los

iones de magnesio son fundamentales para la construcción de las moléculas de clorofila (Dimassi-Theriou y Bosabalidis, 1997) y constituyen el catión divalente más abundante del citosol (Hermans *et al.*, 2004). (Shaul, 2002)

Por otro lado, concentraciones altas de nitrógeno foliar a menudo son relacionadas con alta productividad y tasas fotosintéticas (Manter *et al.*, 2005) esto es debido a que el nitrógeno participa en la fijación de carbono durante el ciclo de Calvin, de este modo del 20 al 30% del nitrógeno total de hoja forma parte de la enzima Rubisco (Feller *et al.*, 2007). Además al aumentar el contenido de nitrógeno foliar podrían incrementarse las tasas de respiración. Dicha relación se debe al aumento en el recambio y reparación de las proteínas que componen la maquinaria fotosintética (Manter *et al.*, 2005).

Dado que SLA no tuvo cambios significativos para la variable altitud ni para la variable *Azorella*, seguramente el peso de las hojas en el sitio 4700 aumentó únicamente como resultado de un incremento en el área foliar. Es decir ya que si el grosor de la hoja no sufrió variaciones se esperaría que un incremento en el peso foliar ocurra únicamente debido a la expansión del área foliar. Esto pudo deberse principalmente a que un aumento en el nitrógeno puede ocasionar un incremento tanto la tasa de expansión de las hojas como en la división celular (Niinemets *et al.*, 2002; Amanulla *et al.*, 2009).

El efecto benefactor mencionado anteriormente pudo deberse a que las formas de vida como cojín son capaces de generar condiciones microclimáticas que moderan las condiciones del entorno, o proporcionan recursos para el establecimiento de otras especies (Antonsson *et al.*, 2009; Sklenar, 2007b; Cavieres, *et al.*, 2002). Estudios realizados en el mismo sitio de estudio, revelaron que *Azorella aretioides* no genera un microclima benéfico

para otras especies, al contrario *Azorella aretioides* genera efectos negativos de la temperatura por encima y por debajo de la superficie del suelo (Anthelme *et al.*, aceptado).

Sin embargo, en el presente estudio se demostró que el suelo de almohadillas para el sitio 4700 es rico en nutrientes como el magnesio y el potasio, esto pudo deberse a que las almohadillas tienen la capacidad de mejorar el ambiente físico de las plantas debido al incremento en la materia orgánica, que se produce por una lenta descomposición de materia vegetal en el interior de la almohadilla (ver también Sklenar, 2007b). Además, Anthelme *et al.*, (aceptado) encontró que los suelos de *Azorella aretioides* presentan mayor humedad relativa para el sitio 4700. Por este motivo, el efecto positivo de *Azorella aretioides* sobre la capacidad fotosintética y sobre una mayor área foliar de *Lasiocephalus ovatus* para el sitio 4700 pudo ocurrir debido a la influencia del magnesio foliar, potasio foliar, y de suelos más húmedos.

Dado que el efecto positivo de *Azorella aretioides* sobre los suelos ocurrió únicamente en el sitio 4700, se comprueba nuevamente la hipótesis del gradiente de estrés (Bertness y Callaway, 1994; Callaway, 2007; Brooker *et al.*, 2008), en un ambiente donde dicha hipótesis está muy poco conocida: ambientes tropicales alpinos (Anthelme *et al.*, aceptado).

Sin embargo, a pesar de las ventajas que *Azorella aretioides* pudo haber conferido a *Lasiocephalus ovatus*, estas no constituyen un factor determinante para la colonización de los sitios con mayor estrés físico, ya que el límite altitudinal superior de *Azorella aretioides* llega hasta los 4700 m. y *Lasiocephalus ovatus* crece hasta los 4800m. (se han observado individuos a 4900 m. al límite del glaciar 15 del Antisana (Cauvy-Fraunié 2010) . Sin

embargo, la importancia de *Azorella aretioides* puede radicar en que es capaz de extender las poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del sitio 4700.

Debido a la alta plasticidad en los rasgos de vida *Lasiocephalus ovatus*, ha sido capaz de colonizar por sí sólo los hábitats prístinos dejados por el retroceso del glaciar, donde no hay la presencia de *Azorella aretioides*.

Por lo tanto, el efecto benefactor de *Azorella aretioides* puede ser indispensable para la colonización de plantas con ausencia de plasticidad fenotípica. Anthelme *et al.*, (aceptado) demostró un efecto positivo de *Azorella aretioides* sobre la diversidad de especies a nivel de comunidades, este incremento fue mayor en el límite altitudinal superior de *Azorella aretioides* (4700 m.). Por este motivo, es muy probable que muchas de estas especies (con el mismo límite altitudinal que la almohadilla) dependan de *Azorella aretioides* para colonizar zonas de alto estrés abióticos como el sitio 4700.

6.3. ESTRUCTURA GENÉTICA Y GRADIENTE ALTITUDINAL

Para explicar el pico registrado en la diversidad genética (H_e) para el sitio 4500, se sugiere un escenario durante el proceso de colonización y sucesión vegetal a lo largo del gradiente altitudinal, en el cual el sitio 4500 actuó como un centro de dispersión para las demás sitios. De este modo en un período en el que las poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* se encontraban en contracción es probable que el sitio 4500 actuara como un refugio génico. Situación similar ocurrió durante el Pleistoceno (Teoría del refugio). Según dicha, teoría los cambios drásticos en la temperatura provocaban que ciertas poblaciones vegetales se

mantuvieran aisladas en pequeños hábitats que ofrecían las condiciones apropiadas para la supervivencia (Mayr y O'Hara, 1986).

Antes de la pequeña edad el hielo (1730 d.c. aprox.), el límite de los glaciales en la cordillera ecuatoriana probablemente estaba ubicado a una altitud de alrededor de 5000 m. (en el volcán Antisana probablemente se encontraba a 4900 m.), (Jomelli *et al.*, 2009) en este momento *Lasiocephalus* pudo haber tenido un rango de distribución desde los 4500 m. hasta los 5000 m.

Sin embargo, durante la pequeña edad el hielo (1730 d.c. aprox.) el límite de los glaciales descendió hasta los 4600 m. (Jomelli *et al.*, 2009), restringiendo el rango altitudinal de *Lasiocephalus ovatus*. Debido a la rapidez del cambio, probablemente *Lasiocephalus ovatus* no pudo migrar bajo este rango, ya que seguramente existía mucha competencia interespecífica, razón por la cual 4500 m. fue el límite altitudinal inferior de *Lasiocephalus ovatus*.

A pesar de que en el sitio 4200 el porcentaje de cobertura vegetal es similar al de 4500, se esperaría que la competencia ocurrida a 4200 m. sea más fuerte, debido a que la comunidad vegetal a este nivel altitudinal está compuesta por especies de mayor altura y con más biomasa (Cornelissen *et al.*, 2003; Keddy *et al.*, 2002).

Posteriormente con el calentamiento en la temperatura que ha sufrido el planeta al finalizar la pequeña edad del hielo (1730 dc. aprox.), el glaciar ha estado retrocediendo gradualmente hasta que su límite se ha ubicado en los 4900 m. (Ortiz, 2010). Es probable

que *Lasiocephalus* haya migrado rápidamente debido a que posee un buen sistema de dispersión (anemocoria) (Cauvy-Fraunié, 2010).

Dicha sucesión vegetal, producida después del retroceso del glacial, pudo haber empezado con relativa rapidez, debido a una buena capacidad de las semillas para ser dispersadas por el viento (Nagy y Grabherr, 2009).

En tales circunstancias, es posible esperar, a nivel de los procesos de regeneración de la vegetación, una dispersión a larga distancia, lo que permitiría una explotación de los sitios nuevos que se van generando producto del retroceso (Castor, 2002).

Sin embargo, se sugiere que la dispersión no solo fue ascendente, una vez que el clima empieza a cambiar se esperaría que el calentamiento climático aumente los niveles de perturbación dentro de un ecosistema específico, por este motivo es razonable esperar que hasta cierto punto, se relajen las fuerzas competitivas como un filtro selectivo para el ensamble de las comunidades (Lenoir *et al.*, 2010). Por este motivo es de esperarse que empiece una colonización descendente desde el sitio 4500 hacia sitios de altitud más bajos como 4400 y 4200. Ya se ha observado que algunas especies tanto animales como vegetales han presentado migraciones descendentes como respuesta al incremento en la temperatura global (Lenoir *et al.*, 2010; Frei *et al.*, 2010)

De este modo, se explicaría que 4500 sea el sitio con la diversidad genética más alta, ya que los eventos de dispersión desde la parte central del rango de población pueden causar efectos en la variación genética de las poblaciones resultantes (Thomson, 1999). La reducción en la variabilidad genética de las nuevas poblaciones se produce por el impacto

en las frecuencias de los alelos y en la diversidad genética, debido a que las semillas de los inmigrantes llevan solamente una pequeña muestra de los alelos de la población de origen (Lopez *et al.*, 2010).

Sin embargo, niveles altos de flujo genético pueden contrabalancear la pérdida de diversidad genética provocada tanto por el estrés ambiental (Gonzalo –Turpin y Hazard, 2009; Biars *et al.*, 2007), como por la reducción de alelos provocados por el efecto fundador (Austerlitz *et al.*, 2000; Lopez *et al.*, 2010; Vandewoestijne *et al.*, 2008) es por este motivo que todas las poblaciones tienen valores altos de heterocigocidad esperada (valores sobre 0.7). El alto flujo genético puede deberse a la anemocoria que es un evento de dispersión a larga distancia que generalmente se produce cuando existen extremos en la velocidad horizontal del viento o turbulencias (Bullock y Clarke, 2000), aquí las plantas han desarrollado muchas estrategias para dispersar sus semillas. Este es el caso de la familia Asteraceae que posee propágulos livianos que presentan estructuras plumosas, que facilitan el arrastre por el viento con mayor capacidad de dispersarse y colonizar nuevos hábitats (Andersen, 1993).

Precisamente, el mencionado flujo genético a partir de las población del sitio 4500 podría ser evidenciado por el PCA de distancias genéticas de Bruvo *et al.*, (2004) (figura 16). En él se puede observar que la población del sitio 4500 posee un rango mayor dentro de los componentes principales del PCA, y comparte más cantidad de alelos con el resto de poblaciones. Este patrón ser otra evidencia que sugiere que probablemente los individuos de la población perteneciente al sitio 4500 dieron origen al resto de las poblaciones del gradiente altitudinal.

Al mismo tiempo, dado que el sitio 4500 posee la diversidad genética más alta, se sugiere que dichos niveles altos de diversidad genética pueden mejorar el potencial adaptativo de las especies. Esto se debe a que en un organismo con una alta diversidad genética es menos probable que la deriva génica fije alelos deletéreos, que generalmente no confieren una capacidad adaptativa al organismo (Vandewoestijne *et al.*, 2008).

De esta manera, es probable que exista un vínculo entre la estructura genética, los rasgos de vida ecológicos y la fisiología de la planta. Este vínculo puede traducirse en un óptimo ecofisiológico. Li *et al.*, (2006) propone que la posición intermedia del gradiente altitudinal constituye el óptimo fisiológico de la especie, además encontró los valores más altos de SLA precisamente en el centro del gradiente altitudinal. En el presente estudio también se registraron los valores más altos de SLA en el centro del gradiente altitudinal. Gonzalo-Turpin *et al.*, (2009) demostró que variaciones en rasgos de vida como SLA tienen una base genética. Bajo esta premisa se sugiere que la diversidad genética podría estar correlacionada con la SLA de las hojas. Dicha correlación mostró ser significativa al comparar los valores de diversidad genética con la media de SLA en cada altitud ($R^2 = 0.71$, $P = 0.01$) (figura 17).

Estos resultados se suman a la hipótesis según la cual los máximos valores de SLA reflejan óptimas condiciones eco fisiológicas para las especies de plantas a lo largo de gradientes altitudinales, según lo sugerido por Li *et al.*, (2006).

Dado que los resultados del test de Matel mostraron que no existe una correlación positiva ni significativa entre las distancias genéticas (F_{st} ; tabla 6) y las variables microclimáticas y edáficas de las poblaciones que componen el gradiente altitudinal (tablas 8 y 9), la

diferencia genética observada entre las poblaciones puede ser ocasionada por más de una fuerza o motivo.

Esto sugiere que la diferenciación genética en el gradiente altitudinal no se produjo únicamente debido a la selección natural impuesta por el gradiente de estrés, sino que pudo haber sido ocasionada también por eventos históricos tales la colonización de los diferentes pisos altitudinales, a raíz de las fluctuaciones glaciares. Como se mencionó anteriormente esto ocurrió después de la pequeña edad del hielo (1750 AD, ref Jomelli *et al.*, 2009), produciéndose una concomitante migración ascendente y descendente de las poblaciones.

En este escenario se esperarían que el efecto fundador además de reducir la diversidad dentro de la población tiende a aumentar la diferenciación genética de las poblaciones colonizadoras (Austerlitz *et al.*, 2000). De este modo, *Lasiocephalus ovatus* se adaptó biológicamente (en su estructuración genética y en los rasgos fenotípicos) a las restricciones ambientales a lo largo del gradiente altitudinal.

Por consiguiente, se sugiere que una parte sustancial de la variación en los rasgos fenotípicos podría ser explicada por una base genética y no sólo la plasticidad (Royer *et al.*, 2009; Körner, 2003; Cordell *et al.*, 1997).

El patrón que presentan los individuos de *L. ovatus* del sitio 4400 para el PCA de Bruvo *et al.*, (2004) puede explicarse por otro tipo de influencias que no se observan en los demás sitios del gradiente. Se sugiere que la divergencia molecular relativamente fuerte observada en el PCA se debe al hecho de que este sitio está localizado en la intersección entre dos valles. Dicha localidad se caracteriza por vientos dominantes (significativamente los más

fuertes del gradiente altitudinal ; tabla 3), que favorecen la dispersión desde el valle del norte. De este modo es posible que debido a los fuertes vientos registrados para el sitio la dispersión haya favorecido que material genético proveniente de otras poblaciones de la zona norte del Antisana proveyeran de nuevos alelos a los individuos del sitio 4400.

La ausencia de variaciones significativas entre los sitios de 4700 y 4800 podría reflejar el hecho de que la colonización reciente de *Lasiocephalus ovatus* no permite que ambas poblaciones se diferencien genotípicamente hasta ahora.

7. CONCLUSIONES

En base a esta información podemos concluir que la alta plasticidad de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente explica su amplia distribución altitudinal y su éxito como colonizador.

De este modo ciertos rasgos como densidad de hojas por longitud de tallo y altura de la planta están relacionados directamente con el gradiente de estrés y otros como SLA presentan patrones más complejos.

En los primeros niveles del gradiente altitudinal SLA se incrementa a fin de maximizar la eficiencia fotosintética. En el extremo superior del gradiente altitudinal las hojas pueden presentar rasgos foliares conservativos (hojas más robustas) que le permiten soportar el estrés térmico al final del gradiente altitudinal.

El efecto nodriza por parte de *Azorella aretioides* sobre *Lasiocephalus ovatus* para el sitio 4700 comprueba la hipótesis del gradiente de estrés. *Azorella aretioides* facilita la acumulación de biomasa en *Lasiocephalus ovatus* en el sitio 4700. Sin embargo debido a la alta plasticidad fenotípica y a la alta dispersión de semillas, *Lasiocephalus ovatus* es capaz de colonizar pisos altitudinales en los cuales no se ha registrado crecimiento de *Azorella aretioides*.

La divergencia molecular entre las poblaciones del gradiente, a pesar de la corta distancia del mismo, probablemente ocurrió debido a varios factores; abióticos, bióticos e históricos. Así, la adaptación al estrés ambiental sumada a los diferentes momentos de colonización y

sucesión vegetal de los diferentes niveles altitudinales han diferenciado genéticamente a las poblaciones que ocupan los niveles altitudinales del gradiente.

A pesar de la fuerte selección que actúa sobre *Lasiocephalus ovatus* la diversidad genética no se vio mayormente disminuida, esto probablemente es el resultado del flujo génico provocado por una buena dispersión.

Los valores de diversidad genética podrían reflejar un óptimo ecofisiológico correlacionado con el fitness de la planta, el cual probablemente es el resultado potencial de eventos históricos (fluctuaciones glaciares) y del estrés abiótico (fisiología).

8. LITERATURA CITADA.

- Amanullah. Martwat, K., Sham, P., Maula, N., Arifullah, S. 2009. Nitrogen levels and its time of application influence leaf area, height and biomass of maize planted at low and high density. *Pakistan Journal of Botany* 41(2): 761-768.
- Andersen, M. 1993. Diaspore Morphology and Seed Dispersal in Several Wind-Dispersed Asteraceae. *American Journal of Botany* 8 (5): 487-492
- Anthelme F., Buendia B., Mazoyer C., Dangles O. (aceptado). Unexpected mechanisms sustain the stress gradient hypothesis in a tropical alpine environment. *Journal of Vegetation Science*.
- Austerlitz, F.,Mariette, S.,Machon, N.,Gouyon, P.,Godelle, B. 2000. Effects of Colonization Processes on Genetic Diversity: Differences Between Annual Plants and Tree Species. *Genetics* 154 (3): 1309-1321
- Becker, A., Körner, C., Brun, J., Guisan, A., Tappeiner, U. 2007. Ecological and Land Use Studies Along elevational Gradients. *Mountain Research and Development* 27 (1): 58-65
- Beniston, M. 2003. Climatic change in mountain regions: a review of possible impacts. *Climatic Change* 59 (1) 5-31.
- Bertness, M. D. and Callaway, R.M. 1994. Positive associations in communities. *Trends in Ecology and Evolution* 9 (5): 191-193.
- Bigras, J., Colombo,S. 2001.Conifer cold hardiness. Kluwer academic publishers. Netherlans.

- Billings, W.D. 1973. Artic and alpine vegetation: Similarities, differences, and susceptibility to disturbance. *Bioscience* 23 (12): 697-704
- Brooker, R.W., Maestre, F.T., Callaway, R.M., Lortie, C.L., Cavieres, L.A., Kunstler, G., Liancourt, P., Tielborger, K., Travis, J.M., Anthelme, F., Armas, C., Coll, L., Corcket, E., Delzon, S., Forey, E., Kikvidze, Z., Olofsson, J., Pugnaire, F., Quiroz, C.L., Sacoone, P., Schiffers, K., Seifan, M., Tiuzard, B., Michalet, R. 2008. Facilitation in plant communities: the past, the present, and the future. *Journal of Ecology* 96 (1):18-34.
- Bruvo, R., Michiels, N. K., D'souza, T. G. And Schulenburg, H. 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molecular Ecology* 13 (7) : 2101-2106.
- Bullock, J., Clarke, R. 2000. Long distance seed dispersal by wind: measuring and modelling the tail of the curve. *Oecologia* 124 (4): 506-521.
- Byars, S., Papst, W., Hoffmann, A. 2007. Local adaptation and cogradient selection in the alpine plant, *Poa hiemata*, along a narrow altitudinal gradient. *Evolution* 61 (12): 2925-2941.
- Caceres, B., Francou, B., Favier, V., Bontro, N., Tachker, P., Bucher, R., Taupin, J., Vuille, M., Maisincho, L., Delachaux, F., Chazarin, J., Cadier, E., Villacis, M. 2006. El glaciar 15 del Antisana investigaciones glaciológicas y su relación con el recurso hídrico. *Climate Variability and Change—Hydrological Impacts (Proceedings of the Fifth FRIEND World Conference held at Havana, Cuba, November 2006)* 308: 479-482.

- Caffarena, R.E. 1996. Propiedades dinámicas de carbohidratos. Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.
- Callaway, R., Pennings, S., Richards, C. 2002. Phenotypic plasticity and interactions among plants. *Ecology* 84 (5): 1115-1128.
- Callaway, R.M. 2007. Positive interactions and Independence in plant communities. Springer. The Netherlands.
- Castor, C. 2002. En línea <<http://captura.uchile.cl/jspui/handle/2250/696>> [Consultado en enero, 2011].
- Castrillo, M., Simoes, M. 1997. Leaf non-structural carbohydrates and leaf dry weight per area in three altitudinal populations of *Espeletia Schultzii*. *Weed. Folia Geobot. Phytotax* 32 (4): 355-360.
- Cauvy, S. 2010. Early Plant Succession on a Tropical Glacier Foreland in the Ecuadorian Andes. Tesis de Maestría. Université Paris Sud-11. París Francia.
- Cavieres, L., Arroyo, M., Peñaloza, A., Molina-Montenegro, M., Torres, C. 2002. Nurse effect of *Bolax gummifera* cushion plants in the alpine vegetation of the Chilean Patagonian Andes. *Journal of Vegetation Science* 13 (4): 547-554
- Choler, P. 2005. Consistent shifts in alpine plant traits along a mesotopographical gradient. *Arctic Antarctic and Alpine research* 37 (4): 444-453.
- Clark, LV and Jasieniuk, M. 2010. Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molecular Ecology Resources* 11 (3): 562-566.

- Combes, S., Prentice, M., Hansen, L., Rosentrater, L. 2006. Going, going, gone! Climate change & Global glacier decline 2. En línea [Consultado marzo, 2010].
- Cordell, S., Goldstein, G., Mueller-Dombois D., Webb D., Vitousek, P.M. 1997. Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia* 113 (2):188-196.
- Cornelissen, J.H.C., Lavorel, S., Garnier, E., Díaz, S., Buchmann, N., Gurvich, D.E., Reich, P.B., ter-Steege, H., Morgan, H.D., van der Heijden, M.G.A., Pausas, J.G., Potter, H. 2003. A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Journal of Botany* 51: 335-380.
- Den Hertog, J., Stulen, I., Posthumus F., Poorter, H. 1998. Interactive effects of growth-limiting N supply and elevated atmospheric CO₂ concentration on growth and carbon balance of *Plantago major*. *Physiologia plantarum* 103 (4):451-460.
- Díaz, S., Cabido, M., Casanoves, F. 1998. Plant functional traits and environmental filters at a regional scale. *Journal of Vegetation Science* 9 (1): 113-122.
- Diemer, M., 1998a. Leaf span of high-elevation, aseasonal Andean shrub species in relation to leaf traits and Andean leaf habit. *Global Ecology and Biogeography letters* 7 (6): 457-465.
- Diemer, M., 1998b. Life span and dynamics of leaves of herbaceous perennials in high-elevation environments: news from the elephant leg. *Functional Ecology* 12 (3): 413-425.

- Dimassi-Theriou, K., Bosabalidis, A. 1997. Effects of light, magnesium and sucrose on leaf anatomy, photosynthesis, starch and total sugar accumulation, in kiwifruit cultured *in vitro*. *Plant cell, tissue and organ culture* 47 (2): 127-134.
- Duskova E, Kolar F, Sklenar P, Rauchova J, Kubsova M, Fer T, Suda J, Marhold K, Feller U, Anders I & Mae T (2008). Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* (7): 1615-24.
- ECOLAP Y MAE, 2007. Guía del Patrimonio de Áreas naturales Protegidas del Ecuador. ECOFUND, FAN, DarwinNet, IMG, Quito, Ecuador.
- Feller, U., Anders, I., Mae, T. 2007. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *Journal of Experimental Botany* 59 (7): 1615-1624.
- Flórez, A. 2002. Movilidad altitudinal de páramos y glaciares en los Andes Colombianos. En: Congreso Mundial de Páramos, Memorias (Minambiente, CAR, IDEAM, Conservación internacional) pp.80-97. Paipa, Boyacá, Colombia.
- Frei, E., Bodin, J., Walther, G. 2010. Plant species' range shifts in mountainous areas—all uphill from here? *Botanica Helvetica* 120 (2):117-128.
- Goldstein, G., Meinzer, F. 2006. Influence of insulating dead leaves and low temperatures on water balance in an Andean giant rosette plant. *Plant, Cell & Environment* 6 (8): 649-656.
- Gonzalo-Turpin, H., Hazard, L. 2009. Local adaptation occurs along altitudinal gradient despite the existence of gene flow in the alpine plant species *Festuca eskia*. *Journal of Ecology* 97 (4): 742–751.

- Gottfried, P., Grabherr G. 2003. Effects of climate change on the alpine and nival vegetation of the Alps. *Journal of Mountain Ecology* 7: 9 – 12.
- Hedberg, O. 1992. Missouri Botanical Garden. En línea <<http://www.mobot.org/mobot/research/ecuador/vegetation.shtml>> [Consultado en agosto, 2010]
- Hermans, C., Johnson, G., Strasser, R., Verbruggen, N. 2004. Physiological characterisation of magnesium deficiency in sugar beet: acclimation to low magnesium differentially affects photosystems I and II. *Planta* 220 (2): 344-355.
- Irazabal, J. 2010. Fenología reproductiva de cinco especies de plantas vasculares en el páramo del Antisana, Ecuador. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador.
- Jian, Q., Keming, M., Yuxin, Z. 2009. Leaf-trait relationships of *Quercus liaotungensis* along an altitudinal gradient in Dongling Mountain, Beijing. *Ecological Research* 24 (6): 1243-1250.
- Jomelli, V., Favier, V., Rabatel, A., Brunstein, D., Hoffmann, G., Francou, B. 2009. Fluctuations of glaciers in the tropical Andes over the last millennium and palaeoclimatic implications: A review. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 281 (3-4) 269–282.
- Jump, A., Peñuelas, J. 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology Letters* 8 (9): 1010-1020.
- Kazanskii, A. B. 2010. Katabatic Glacier Wind. *Doklady Earth Sci* 434 (1): 1245-1248.

- Keddy, P., Nielsen, K., Weiher, E., Lawson, R. 2002. Relative competitive performance of 63 species of terrestrial herbaceous plants. *Journal of Vegetation Science* 13 (1): 5-16.
- Körner, C. 2003. *Functional plant ecology of High mountains ecosystems*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Körner, C. 2007. The use of 'altitude' in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (11): 569-574.
- Körner, Ch. 1989. The nutritional status of plants from high altitudes. *Oecologia* 81(3): 379-391.
- Krizek, D.T., Gitz., D.C., Reddy, V.R., Ritchie J.C. 2004. Biomass Accumulation and Partitioning of Eastern Gamagrass Grown Under Different Temperature and CO₂ Levels. *Acta Horticulturae* 638:293-299.
- Kullman, L. 2004. The Changing Face of the Alpine World. *Global Change NewsLetter* 57: 12-14.
- Lavorel, S., Garnier, E. 2002. Predicting changes in community composition and ecosystem functioning from plant traits: revisiting the Holy Grail. *Functional Ecology* 16 (5): 545-556.
- Lenoir, J., Gegout, J., Guisan, A., Vittoz, P., Wohlgemuth, T., Zimmermann, N., Dullinger, S., Pauli, H., Willner, W., Svenning, J. 2010. Going against the flow: potential mechanisms for unexpected downslope range shifts in a warming climate. *Ecography* 33 (2): 295-303
- Li, C., Zhang, X., Liu, X., Luukkanen, O. & Berninger, F. (2006) Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. *Silva Fennica* 40 (1): 5–13.

- Linhart, Y., Grant, M. 1996. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27 (1): 237-277.
- Liu, G., Hegarty, M., Edwards, K., Hiscock, S., Abbott, R. 2004. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Senecio*. *Molecular Ecology Notes* 4(4): 611-614.
- López, P., Tremetsberger, K., Stuessy, T., Gómez-González, S., Jiménez, A., Baeza, C. 2010. Patterns of genetic diversity in colonizing plant species: *Nassauvia lagascae* var. *Lanata* (Asteraceae: Mutisieae) on Volcán Lonquimay, Chile. *American Journal of Botany* 97 (3): 423-432.
- Luteyn, J. 1999. Páramos. A checklist of plant diversity geographical distribution and botanical literature. The New York Botanical Garden press. U.S.A.
- Lynch, M. 1990. The Similarity Index and Dna Fingerprinting. *Molecular Biology and Evolution* 7 (5) 478-484.
- Macek, P., Macková, J., de Bello, F. 2009. Morphological and ecophysiological traits shaping altitudinal distribution of three *Polylepis* treeline species in the dry tropical Andes. *Acta Oecologica* 35 (6) 778-785.
- Maestre, F.T., Callaway, R.M., Valladares, F., Lortie, C. 2009. Refining the stress gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97 (02): 199-205.
- Mahelari, H., De Lucía, E. 2001. Influence of climate-driver shifts in biomass allocation on water transport and storage in ponderosa pine. *Oecología* 129:481-491.

- Manter, D., Kavanagh, K., Rose, C. 2005. Growth response of Douglas-fir seedlings to nitrogen fertilization: importance of Rubisco activation state and respiration rates. *Tree Physiology* 25 (8) 1015-1021.
- Markwith, S. H., Stewart, D. J. And Dyer, J. L. 2006. Tetrasat: A program for the population analysis of allotetraploid microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 8 (6): 586-589.
- McDonald, D. 2008. En línea <<http://www.uwyo.edu/dbmcd/molmark/lect04/lect4.html>> [Consultado en enero, 2011].
- McGraw, J. 1985. Experimental Ecology of *Dryas octopetala* Ecotypes: Relative response to competitors. *New Phytologist* 100 (2): 233-241.
- Mediavilla, S., Escudero, A., 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *Forest Ecology and Management* 187 (2-3): 281-294.
- Meinzer, F., Goldstein, G. 1985. Some consequences of leaf pubescence in the Andean giant rosette plant *Espeletia timotensis*. *Ecology* 66 (2): 512-520.
- Milthorpe, F.L., Newton, P. 1963. Studies on the Expansion of the Leaf Surface: III. The Influence Of Radiation On Cell Division And Leaf Expansion. *Journal of Experimental Botany* 14 (3): 483-495.
- Molina-Montenegro, M.A. 2008. Variación de la pubescencia foliar en plantas y sus implicaciones funcionales a lo largo de gradientes altitudinales. *Ecosistemas* 17 (1): 146-154.
- Morales-Betancourt, J., Estévez-Varón. J. 2006. El Paramo ecosistema en vía de extinción?. *Revista Luna Azul* Volumen 22. En línea

<http://lunazul.ucaldas.edu.co/index.php?option=com_content&task=view&id=44&Itemid=44> [Consultado en marzo, 2010].

Nagy, L., Grabher, G. 2009. The biology of alpine hábitats. Oxford University press, New York, U.S.A.

Niinemets, Ü., Portsmouth, A., Truus, L. 2001. Leaf Structural and Photosynthetic Characteristics, and Biomass Allocation to Foliage in Relation to Foliar Nitrogen Content and Tree Size in Three *Betula* Species. *Annals of Botany* 89 (2): 191-204.

Ortiz, G.2010. As Humans Advance, Andean Glaciers Recede. En línea <<http://ipsnews.net/news.asp?idnews=51813> > [Consultado en enero, 2011].

Piper, F.,Cavieres, L.,Reyes-Díaz, M.,Corcuera,L.2006. Carbon sink limitation and frost tolerance control performance of the tree *Kageneckia angustifolia* D. Don (Rosaceae) at the treeline in central Chile. *Plant Ecology* 185: 29-39.

Poorter,H., Niinemets, Ü., Poorter, L., Wright, I. J., Villar, R. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182 (3): 565–588.

Rada, F., Azocar, A., Gonzalez, J., BriceAo, B. 1998. Leaf gas exchange in *Espeletia schultzei* Wedd, a giant caulescent rosette species, along an altitudinal gradient in the Venezuelan Andes. *Acta Oecológica* 19 (1) 73-79.

Retuerto, R., Ian Woodward, F. 1992. Effects of windspeed on the growth and biomass allocation of white mustard *Sinapis alba* L. *Oecología* 32 (1): 113-123.

Ricardi,M., Gaviria, J., Estrada, J. 1997. La Flora del Superpáramo venezolano y sus relaciones fitogeográficas a lo largo de Los Andes. *Plántula* 1(3): 171-187.

- Roumet, C., Laurent, G., Roy, J. 1999. Leaf structure and chemical composition as affected by elevated CO₂: genotypic responses of two perennial grasses. *New Phytologist* 143 (1): 73-81.
- Royer, D., Meyerson, L., Robertson, K., Adams, J. 2009. Phenotypic Plasticity of Leaf Shape along a Temperature Gradient in *Acer rubrum*. 4 (10): e7653.
- Santos, K., Welter, L., Cibele, Ade., Dantas, M., Guerra, M., Ducroquet, J., Nodari, R. 2007. Transference of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp to *Acacia sellowiana* and the successful use of this technique in genetic characterization. *Genetics and Molecular Biology* 30 (1): 1415-4757.
- Scheepens, J. F., Frei, E.S., Stöcklin, J. 2005. Genotypic and environmental variation in specific leaf area in a widespread Alpine plant after transplantation to different altitudes. *Oecologia* 164 (1):141-150.
- Schlichting, C. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 667-693.
- Shahba, M. A., Qian *, Y. L., Hughes, H. G., Koski, A. J., Christensen, D. 2002. Relationships of Soluble Carbohydrates and Freeze Tolerance in Saltgrass. *Crop Science Society of America* 43(6): 2148-2153.
- Shaul, O. 2002. Magnesium transport and function in plants: the tip of the iceberg. *BioMetals* 15 (3): 309-323.
- Sklenar, P. 1999. Nodding Capitula in Superpáramo Asteraceae: An Adaptation to Unpredictable Environment. *Biotropica* 31 (3): 394-402.

- Sklenár, P. 2001. Notes on taxonomy, distribution and ecology of some Ecuadorian high paramo Asteraceae, tribe Senecioneae. *Compositae Newsletter*. 36: 1-8.
- Sklenar, P. 2007b. Temperature environment of *Xenophyllum humile* (Kunth) V.A. Funk, a high Andean cushion plant. *Arnaldoa* 14(1): 97-104.
- Sklenar, P., Balslev, H. 2005. Superpáramo plant species diversity and phytogeography in Ecuador. *Flora* 200 (5): 416–433.
- Sklenar, P., Balslev, H. 2007. Geographic flora elements in the Ecuadorian superpáramo. *Flora* 200 (1): 416–433.
- Sklenar, P., Bendix, J., Balslev, H. 2008. Cloud frequency correlates to plant species composition in the high Andes of Ecuador. *Basic and Applied Ecology* 9 (5): 504-513.
- Sklenar, P., Lægaard, S. 2003. Rain-Shadow in the High Andes of Ecuador Evidenced by Pa´ramo Vegetation. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research* 35 (1): 8–17.
- Sklenár, P., Luteyn, J., Ulloa, C., Jørgensen, P., Dillon, M. 2005. Flora genérica de los Páramos. Guía ilustrada de las Plantas Vasculares. The New York Botanical Garden. U.S.A.
- Smith, A. 1979. Function of Dead Leaves in *Espeletia schultzii* (Compositae), and Andean Caulescent Rosette Species. *Function of Dead Leaves in Espeletia schultzii* (Compositae), and Andean Caulescent Rosette Species *Biotropica* 11 (1): 43-47.
- Soltis, D., Albert, V., Leebens-Mack, J., Bell, C., Paterson, A., Zheng, C., Sankoff, D., dePamphilis, C., Wall, P., Soltis, P. 2009. Polyploidy and angiosperm diversification. *American Journal of Botany* 96(1): 336-348.

- Spehn, M., Körner, C. 2009. Data Mining for Global Trends in Mountain Biodiversity. CRC Press, London, U.K.
- Sultan, S. 2003. Phenotypic plasticity in plants: a case study in ecological development. *Evolution and development* (5) 1: 25-33.
- Syvrtsen, J. P., Lloyd, J., Mcconchie, C., Kriedemann, P. E. And Farquhar, G. D. (1995), On the relationship between leaf anatomy and CO₂ diffusion through the mesophyll of hypostomatous leaves. *Plant, Cell & Environment* 18: 149-157.
- Takahashi, K., Miyajima Y. 2008. Relationships between leaf life span, leaf mass per area, and leaf nitrogen cause different altitudinal changes in leaf $\delta^{13}\text{C}$ between deciduous and evergreen species. *Botany* 86: 1233-1241.
- Thomson, J. 1999. Population differentiation in Mediterranean plants: insights into colonization history and the evolution and conservation of endemic species. *Heredity* 82: 229–236.
- Van Puyvelde, K., Van Geert, A. And Triest, L. 2010. Atetra, a new software program to analyse tetraploid microsatellite data: comparison with TETRA and TETRASAT. *Molecular Ecology Resources* 10 (2): 331-334.
- Vandewoestijne, S., Schtickzelle, N., Baguette, M. 2008. Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation. *BMC Biology* 6 (1): 46.
- Vile, D., Garnier, E., Shipley, B., Laurent, G., Navas, M., Roumet, C., Lavorel, S., Díaz, S., Hodgson, J., Lloret, F., Midgley, G., Poorter, H., Rutherford, M., Wilson, P., Wright, I. 2005. Specific Leaf Area and Dry Matter Content Estimate Thickness in Laminar Leaves. *Annals of Botany* 96 (6): 1129-1136.

- Watson, J.D., Caudy, A.A., Myers, R.M. & Witkowski, J.A., 2007. Recombinant DNA: Genes and Genomes-A short course. Tercera edición. W.H. Freeman and Company, USA.
- Weiher, E., van der Werf, A., Thompson, K., Roderick, M., Garnier, E., Eriksson, O. 1999. Challenging Theophrastus: A common core list of plant traits for functional ecology. *Journal of Vegetation Science* 10: 609-620
- Woodward, F. I., Bazzaz, F. A. 1988. The Responses of Stomatal Density to CO₂ Partial Pressure. *Journal of Experimental Botany* 39 (209): 1771-1781.
- Yang, D., Li G., Sun, S. 2008. The Generality of Leaf Size versus Number Trade-off in Temperate Woody Species. *Annals of Botany* 102 (4): 623-629.
- Zhang, S., Zhou, Z., Hu, H., Xu, K., Yan, N., Li, S. 2005. Photosynthetic performances of *Quercus pannosa* vary with altitude in the Hengduan Mountains, southwest China. *Forest Ecology and Management* 212 (2005): 291-301.

9. FIGURAS

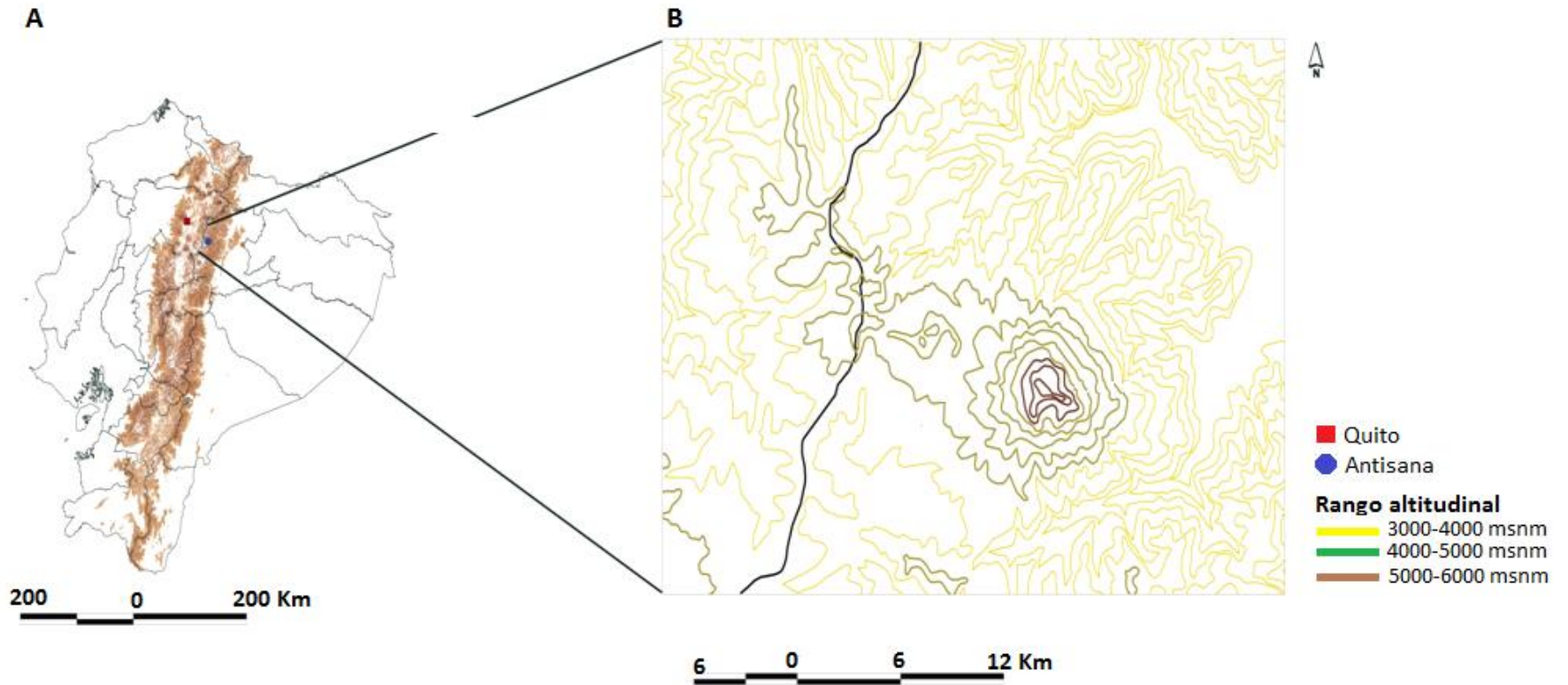


Figura 1. Mapa de ubicación del área de estudio: **A.** Mapa del Ecuador, **B.** Mapa de las faldas occidentales del volcán Antisana, provincia de Napo. (tomado de Irazabal, 2010)

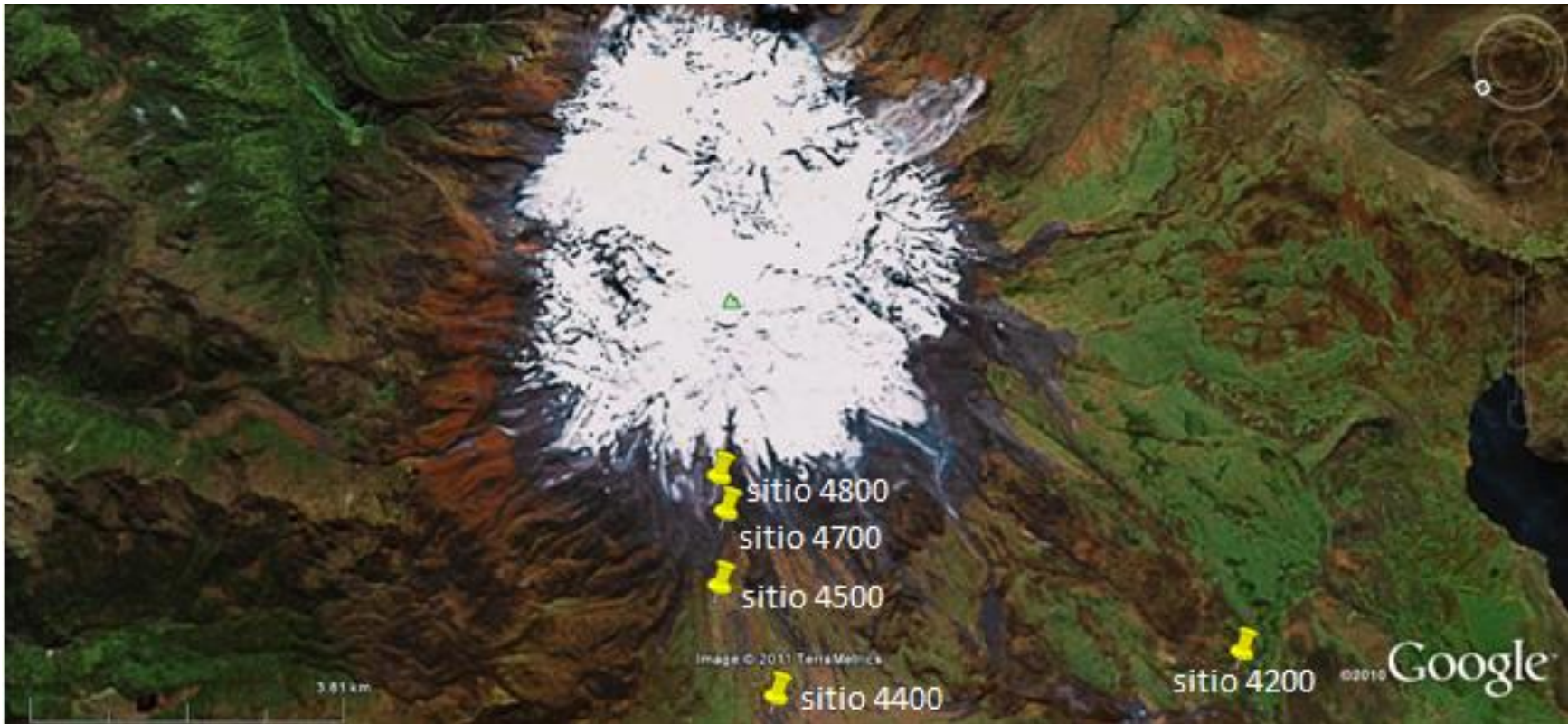
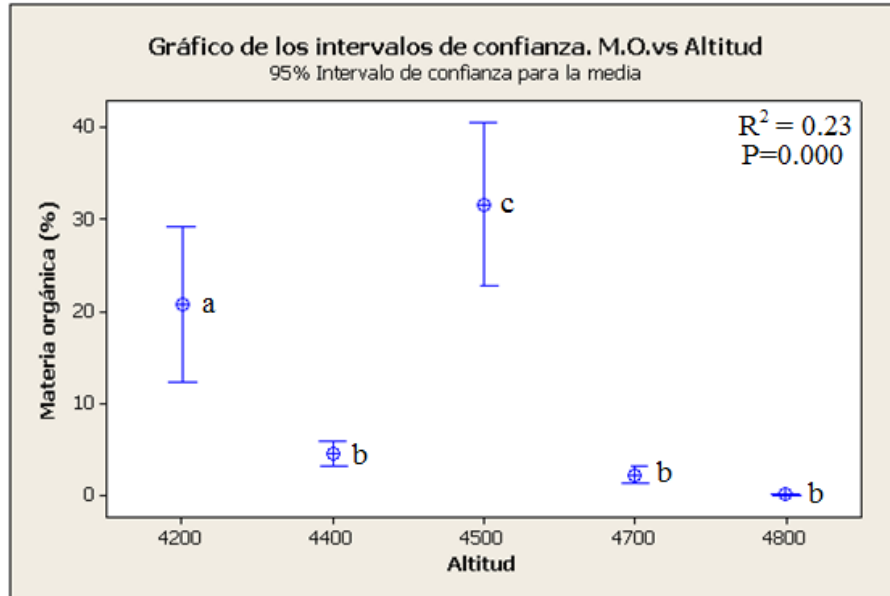


Figura 2. Mapa del gradiente altitudinal. Ubicado sobre la cara occidental del volcán Antisana entre la laguna de Santa Lucía y el Glaciar N° 15. Las figuras en amarillo representan los 5 niveles altitudinales donde se muestreó a *Lasiocephalus ovatus*. Las coordenadas de los niveles altitudinales fueron ingresadas en Google Earth ® para la obtención de este mapa.

a)



b)

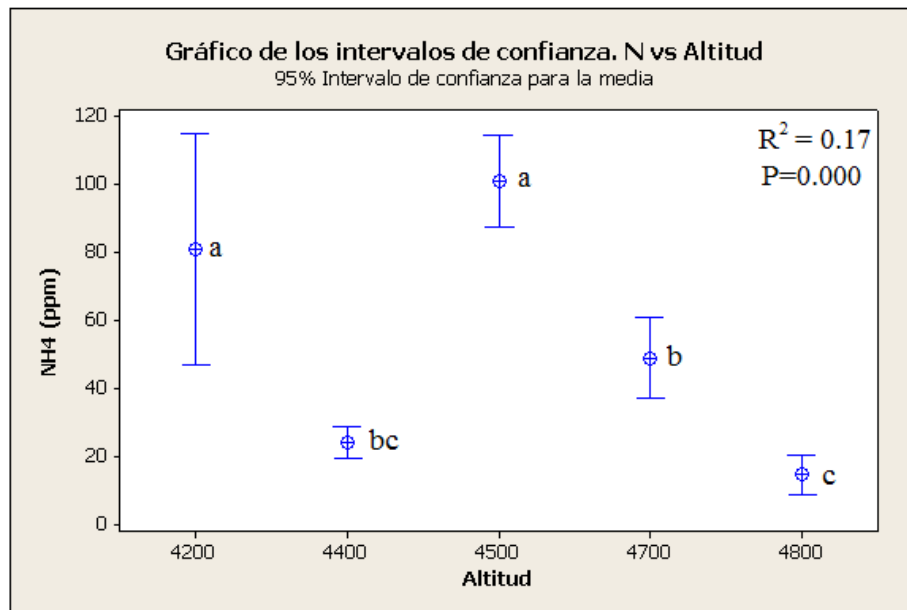
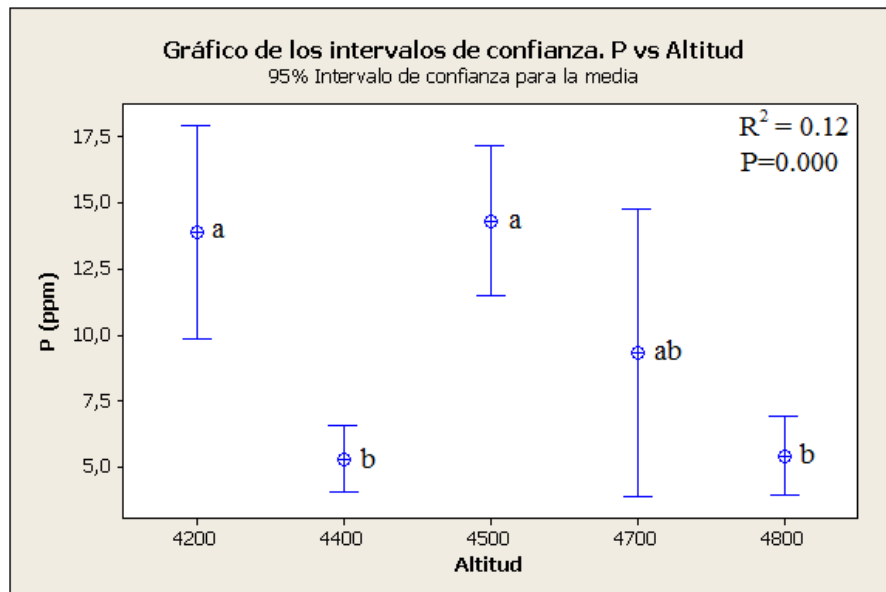


Figura 3. Variaciones en los principales nutrientes del suelo a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) Cantidad de materia orgánica $P=0.00$. b) Nitrógeno (en forma de ión amonio) $P=0.00$. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

a)



b)

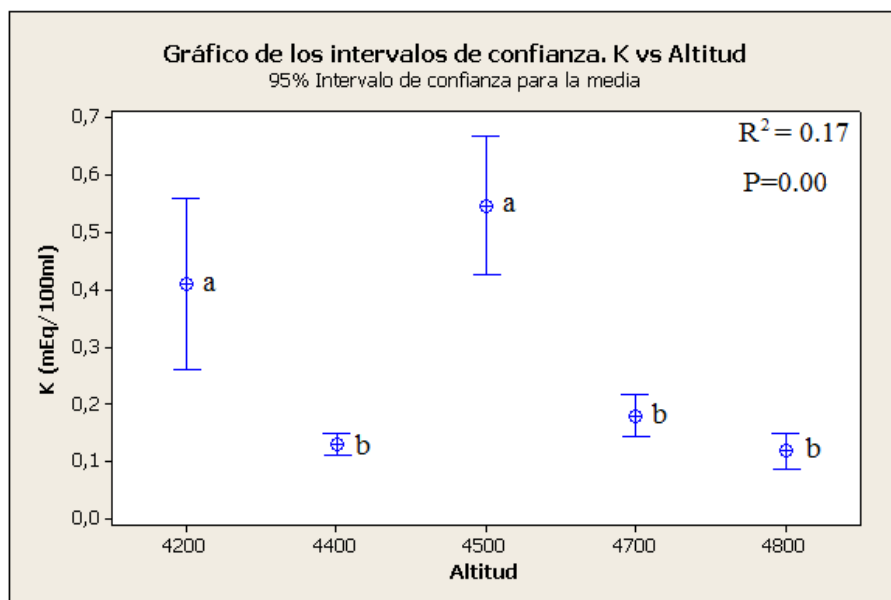


Figura 4. Variaciones en los principales nutrientes del suelo a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) Fósforo $P=0.00$ b) Potasio $P=0.00$. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

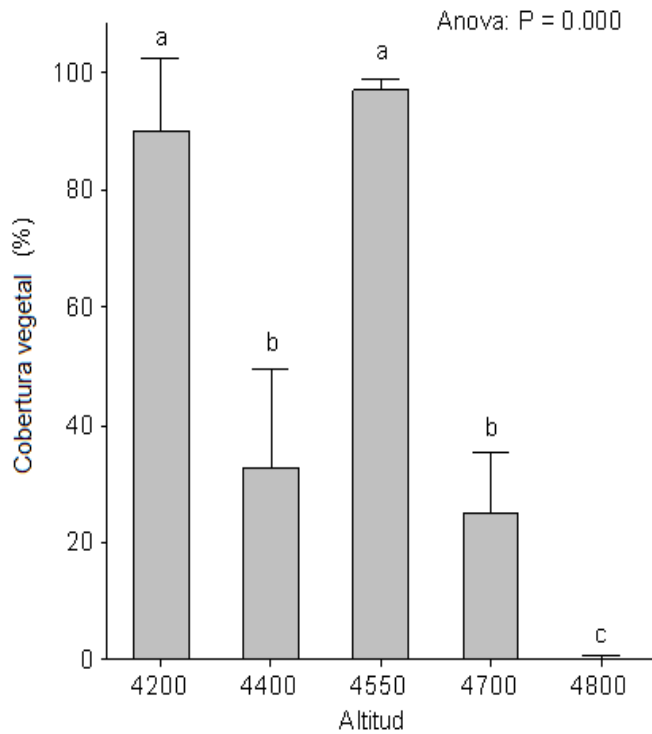


Figura 5. Porcentaje de cobertura vegetal a lo largo del gradiente altitudinal. Se muestra la significancia a lo largo del gradiente (Anova=0.000). Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

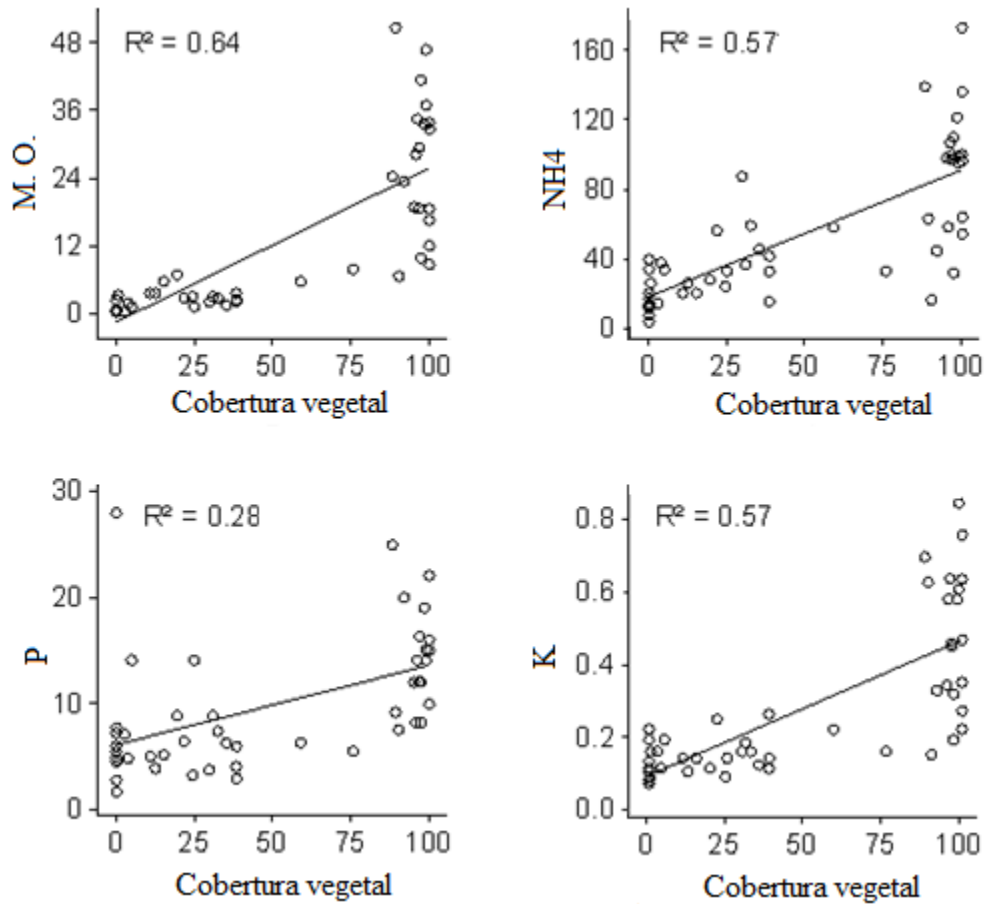
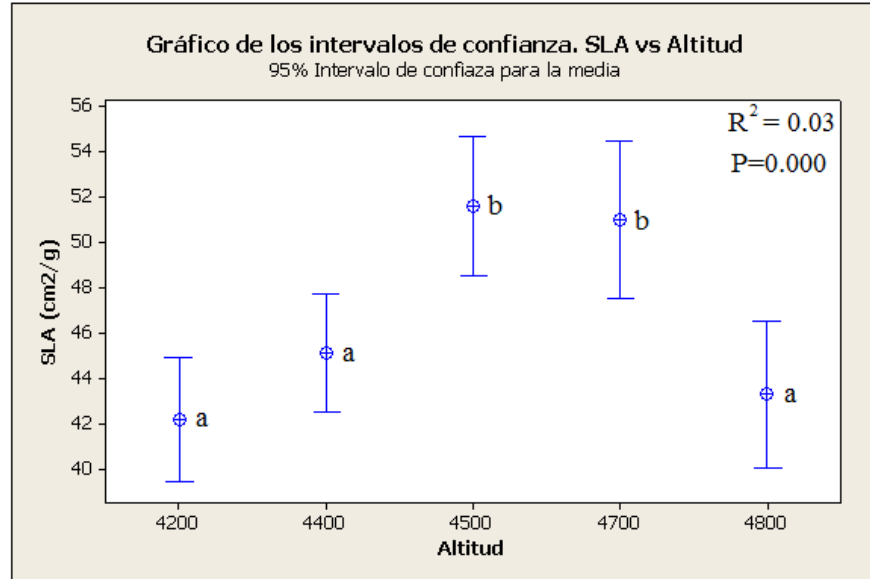


Figura 6. Relaciones entre los nutrientes del suelo y la cobertura vegetal a lo largo del gradiente altitudinal (linealidad comprobada con regresiones lineales: R^2 . *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$). M.O: cantidad de materia orgánica; NH₄: Nitrógeno (en forma de ión amonio); P: Fósforo; K: Potasio.

a)



b)

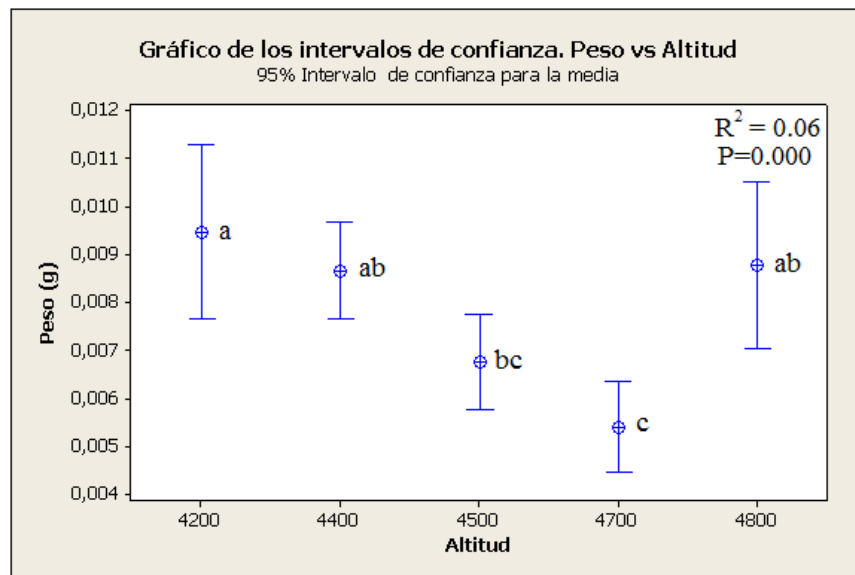
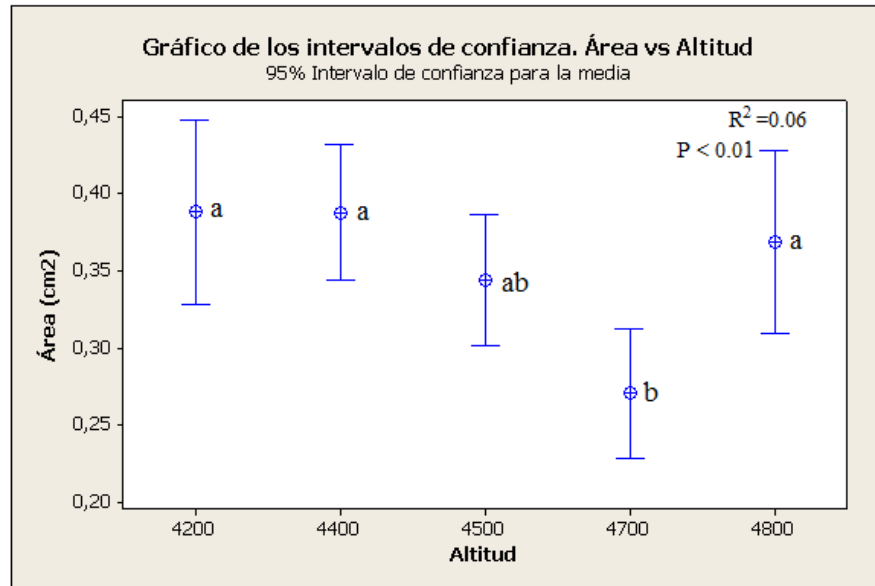


Figura 7. Variaciones en los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) SLA $P=0.00$ b) peso de las hojas $P=0.00$. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

a)



b)

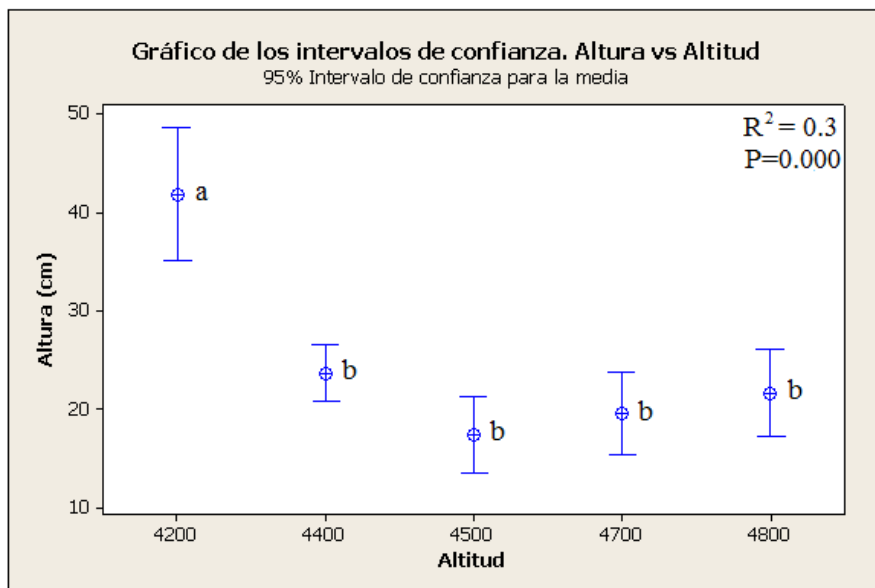
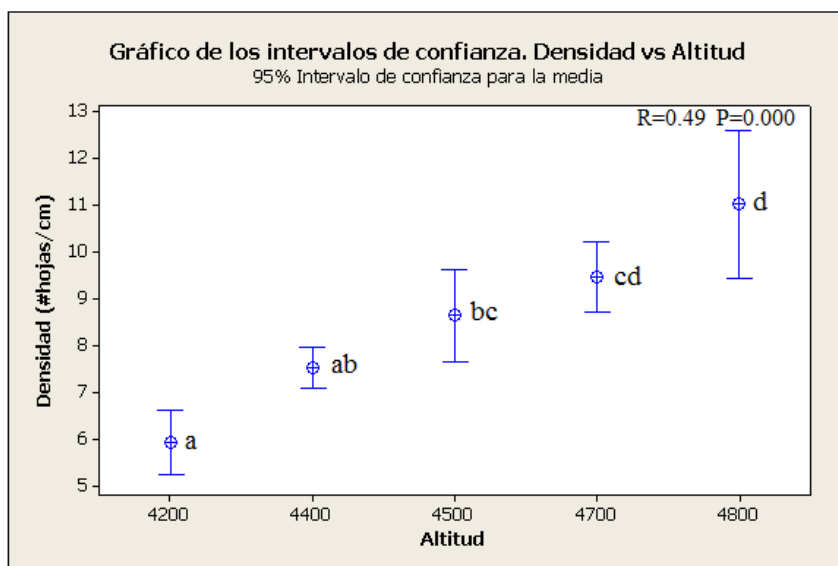


Figura 8. Variaciones en los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) Área foliar $P < 0.01$ b) Altura de la planta $P = 0.000$. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

a)



b)

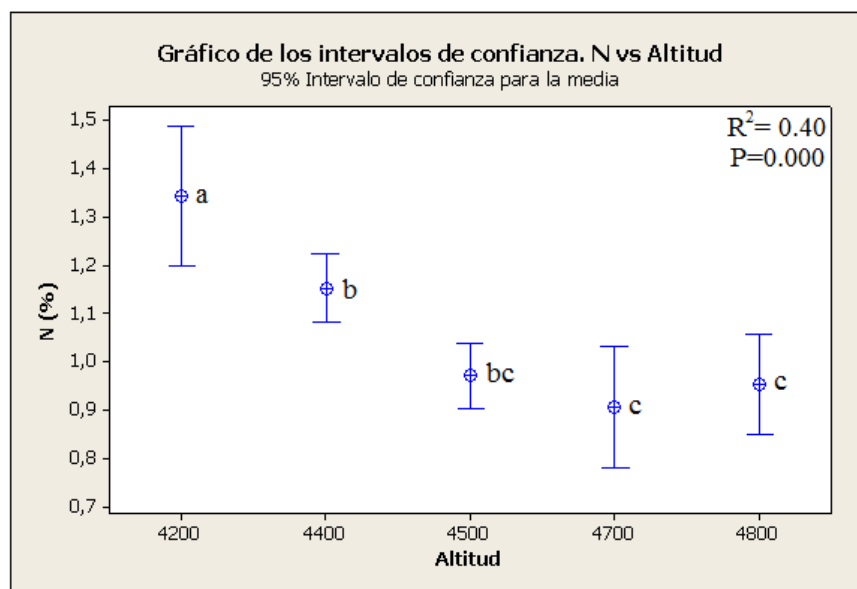
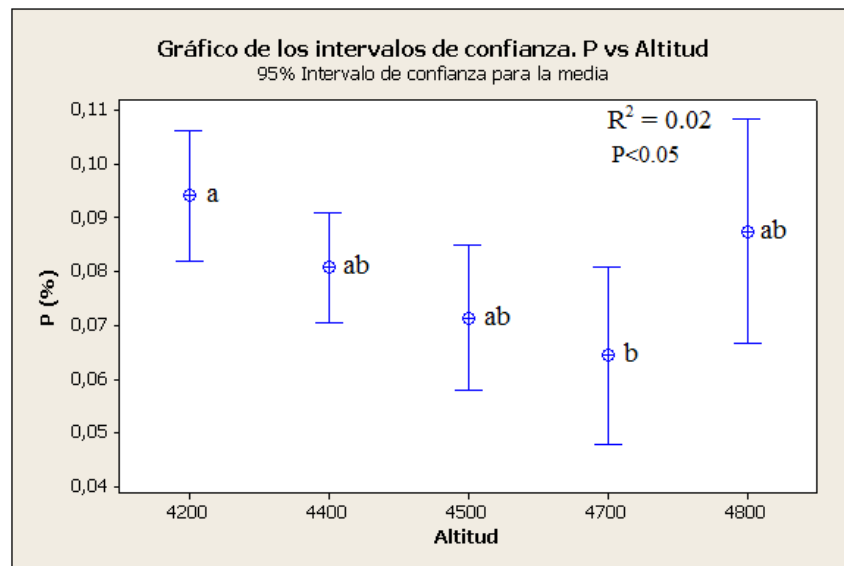


Figura 9. Variaciones en los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) Densidad de hojas por longitud de tallo. P=0.00 b) Contenido de nitrógeno foliar P=0.00. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

a)



b)

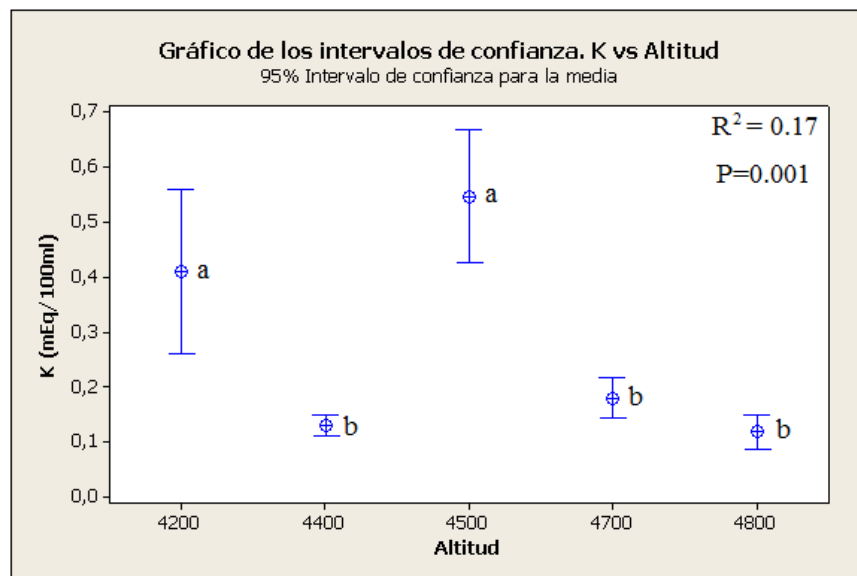


Figura 10. Variaciones en los rasgos de vida de *Lasiocephalus ovatus* a lo largo del gradiente altitudinal representadas en un gráfico de intervalos de confianza. a) Contenido de fósforo foliar $P < 0.05$ b) Contenido de potasio foliar $P = 0.001$. Las letras sobre cada barra representan las diferencias entre cada tratamiento según la pruebas post hoc. de Tukey.

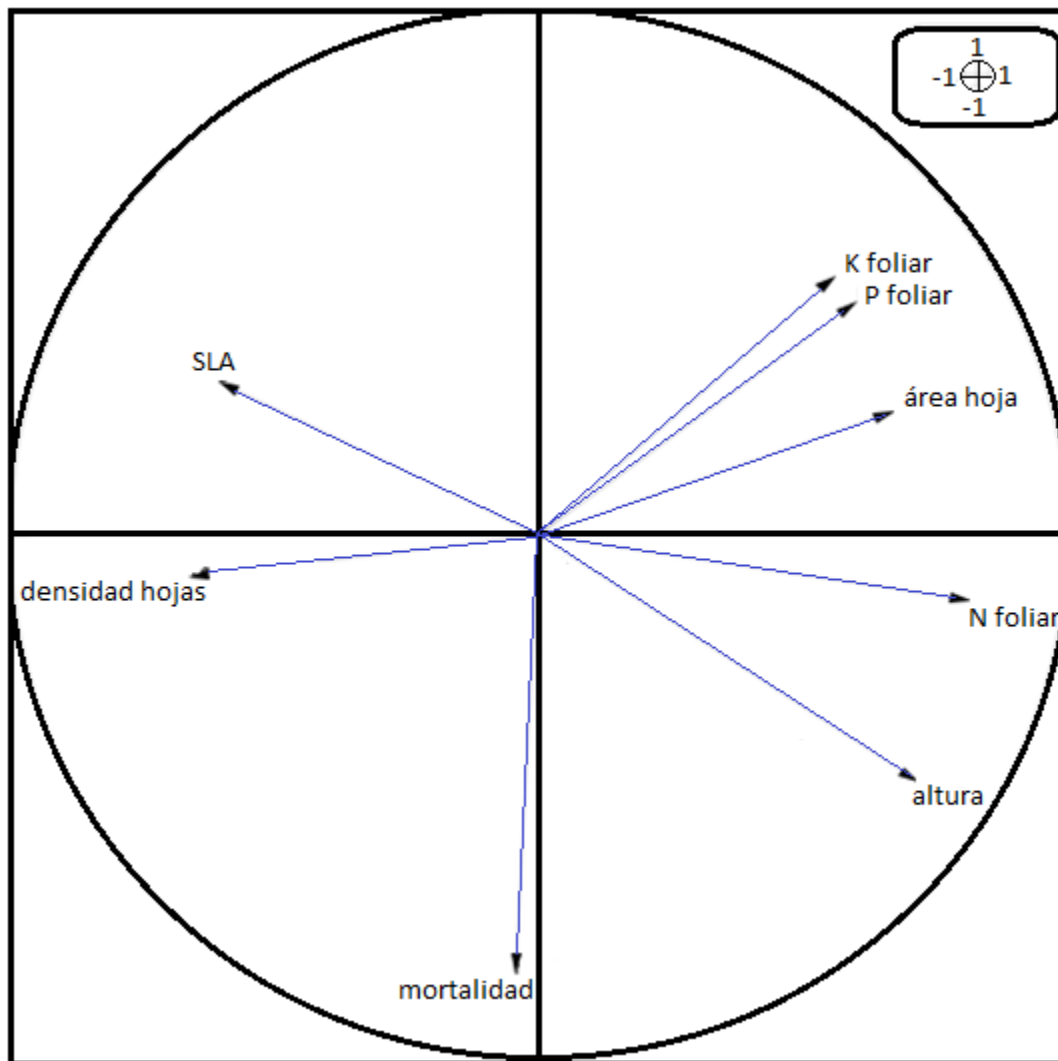
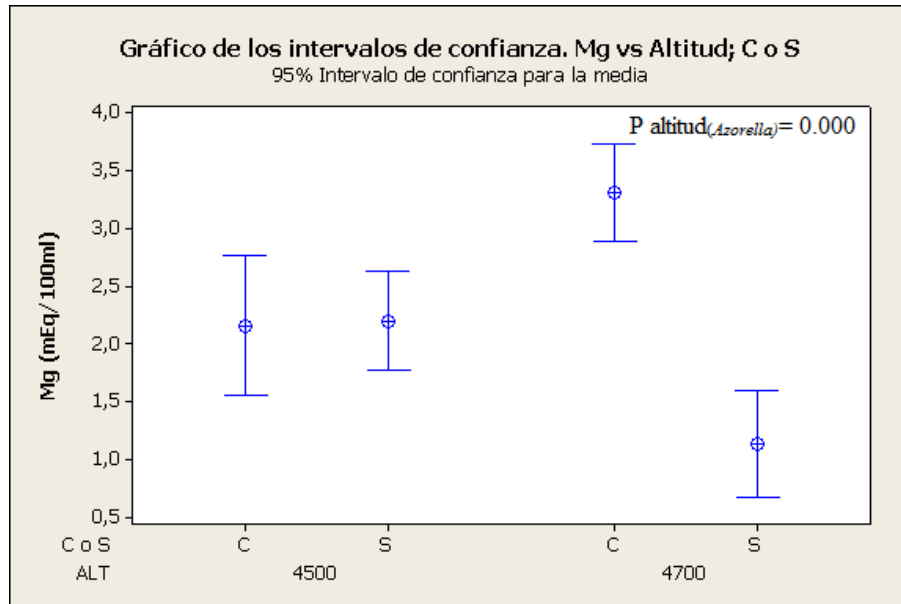


Figura 11. Análisis de componentes principales de los rasgos funcionales de vida. Los valores de los dos ejes principales son 0.36 y 0.19 sobre un total de 1.

a)



b)

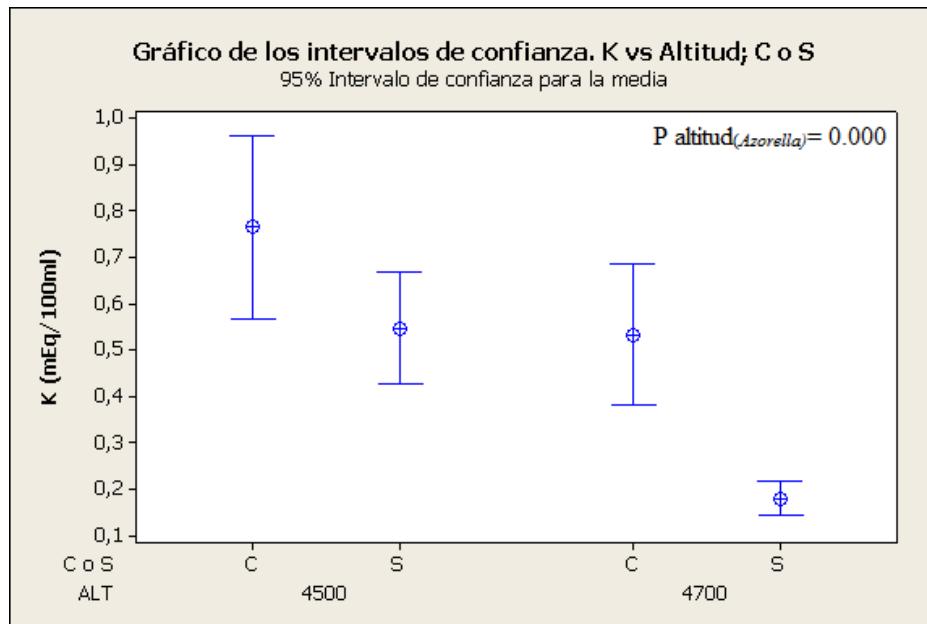


Figura 12. Efecto de *Azorella aretioides* (sobre los nutrientes del suelo) representado en un gráfico de intervalos de confianza (C representa los individuos que crecen sobre almohadillas, S los individuos que crecen sobre suelo desnudo). Se presenta el valor del análisis *Azorella* anidado. a). Magnesio b). Potasio.

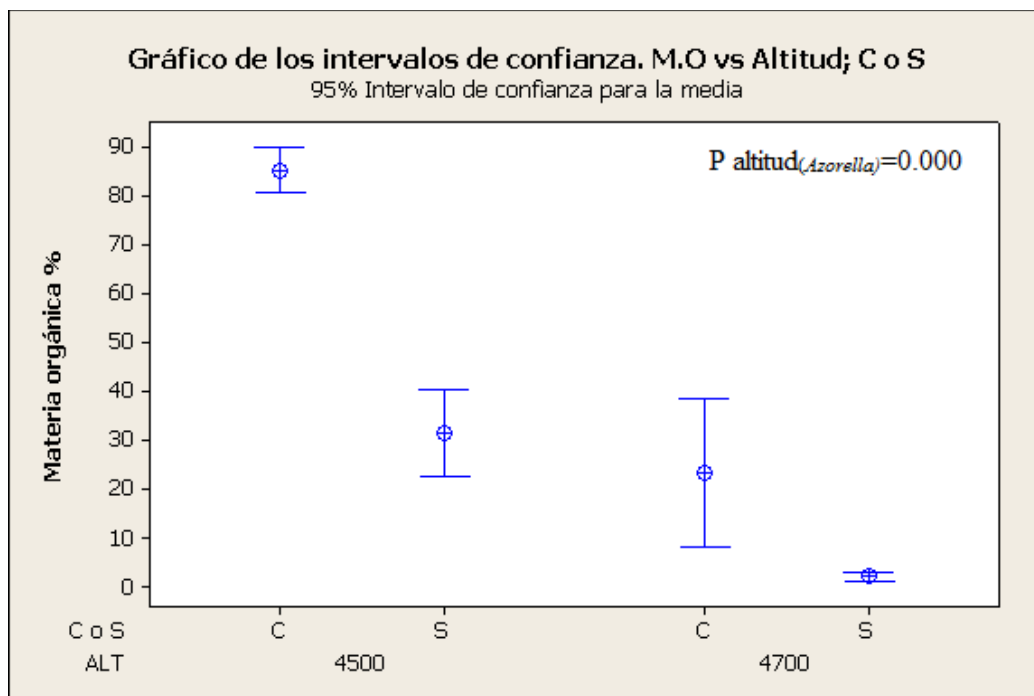
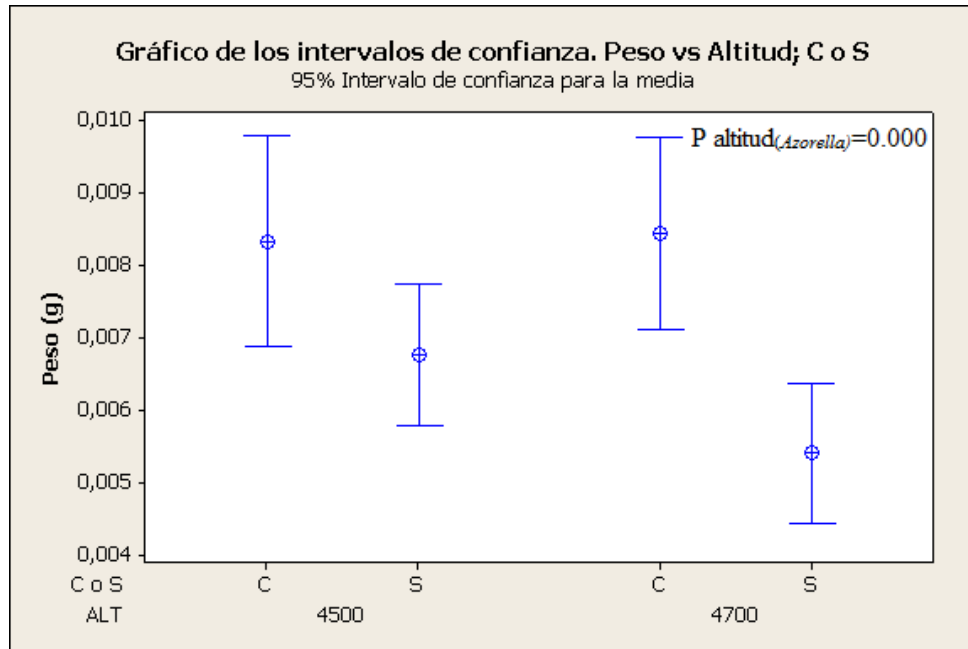


Figura 13. Efecto de *Azorella aretioides* (sobre la materia orgánica de suelo) representado en un gráfico de intervalos de confianza. (C representa los individuos que crecen sobre almohadillas, S los individuos que crecen sobre suelo desnudo). Se presenta el valor del análisis *Azorella* anidado.

a)



b)

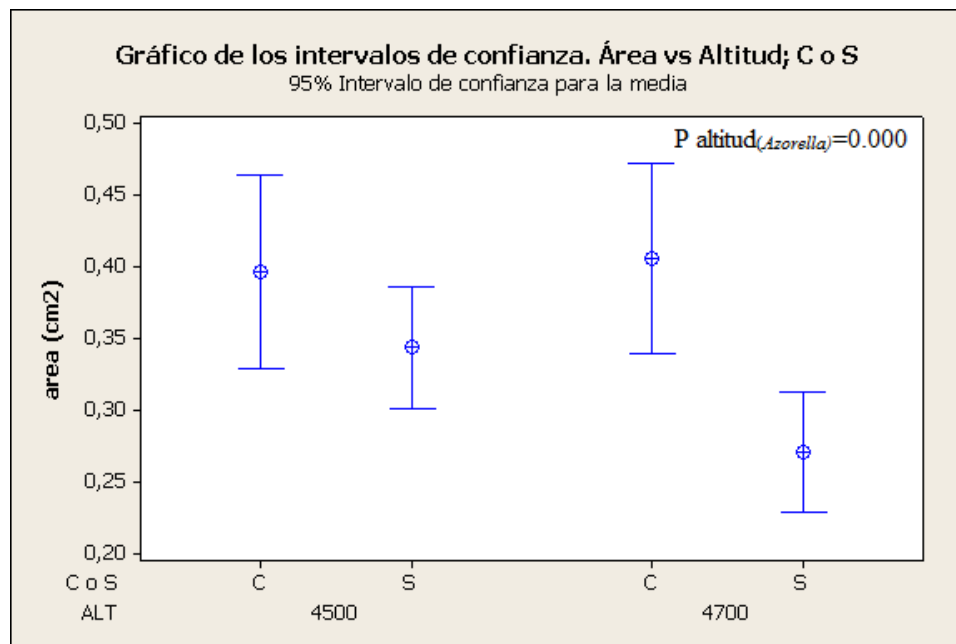
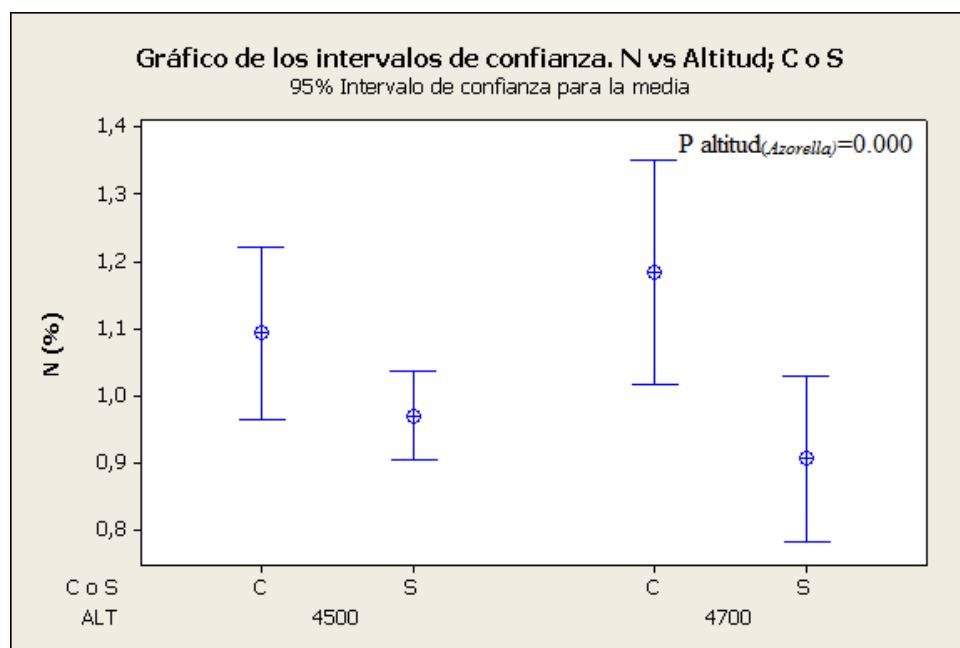


Figura 14. Efecto de *Azorella aretioides* (sobre los rasgos de vida) representado en un gráfico de intervalos de confianza (C representa los individuos que crecen sobre almohadillas, S los individuos que crecen sobre suelo desnudo). Se presenta el valor del análisis *Azorella* anidado. a) Peso foliar b) Área foliar.

a)



b)

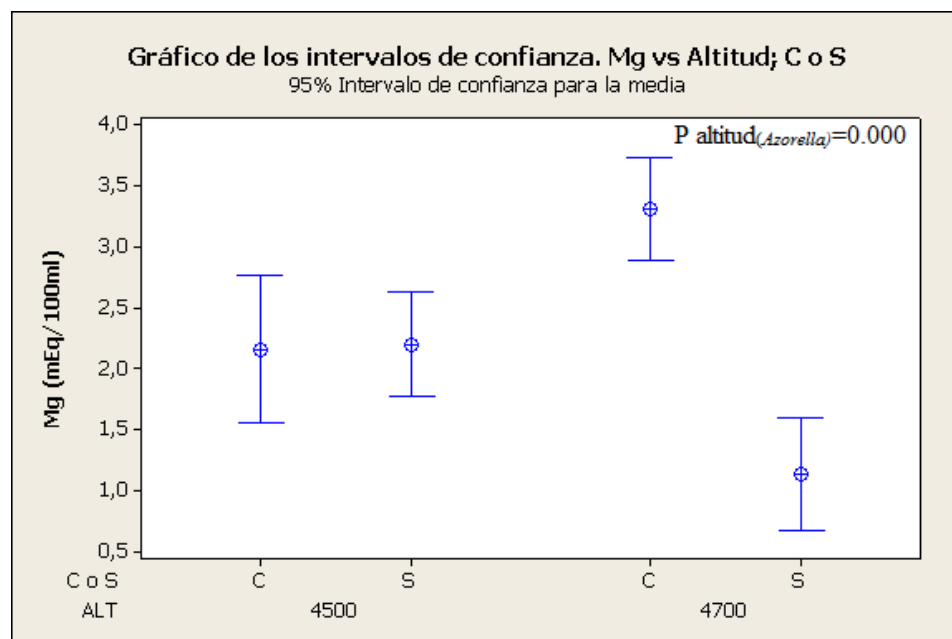


Figura 15. Efecto de *Azorella aretioides* (sobre los rasgos de vida) representado en un gráfico de intervalos de confianza (C representa los individuos que crecen sobre almohadillas, S los individuos que crecen sobre suelo desnudo). Se presenta el valor del análisis *Azorella* anidado. a) Contenido de nitrógeno foliar b) Contenido de magnesio foliar.

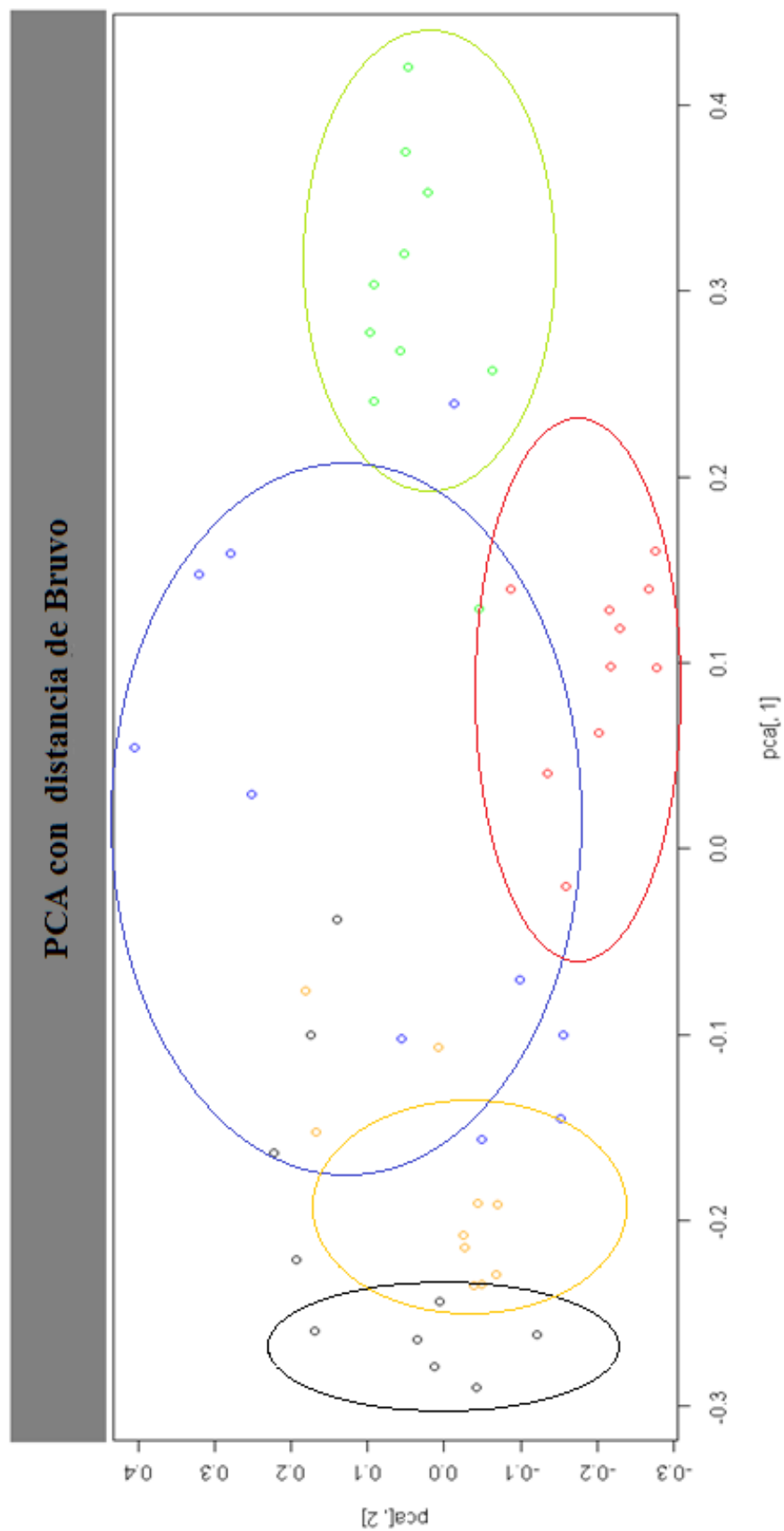


Figura 16. Análisis de componentes principales utilizando el índice de distancia genética de Bruvo *et al.*, (2004). Cada pequeño círculo corresponde a un individuo genotipado en base a 6 microsatélites. Los círculos del mismo color representan individuos de una misma población. De igual manera los círculos grandes delimitan a cada población. Los colores correspondientes a cada población son los siguientes: Color rojo: Sitio 4200. Color verde: Sitio 4400. Color azul: Sitio 4500. Color negro: Sitio 4700. Color naranja: Sitio 4800.

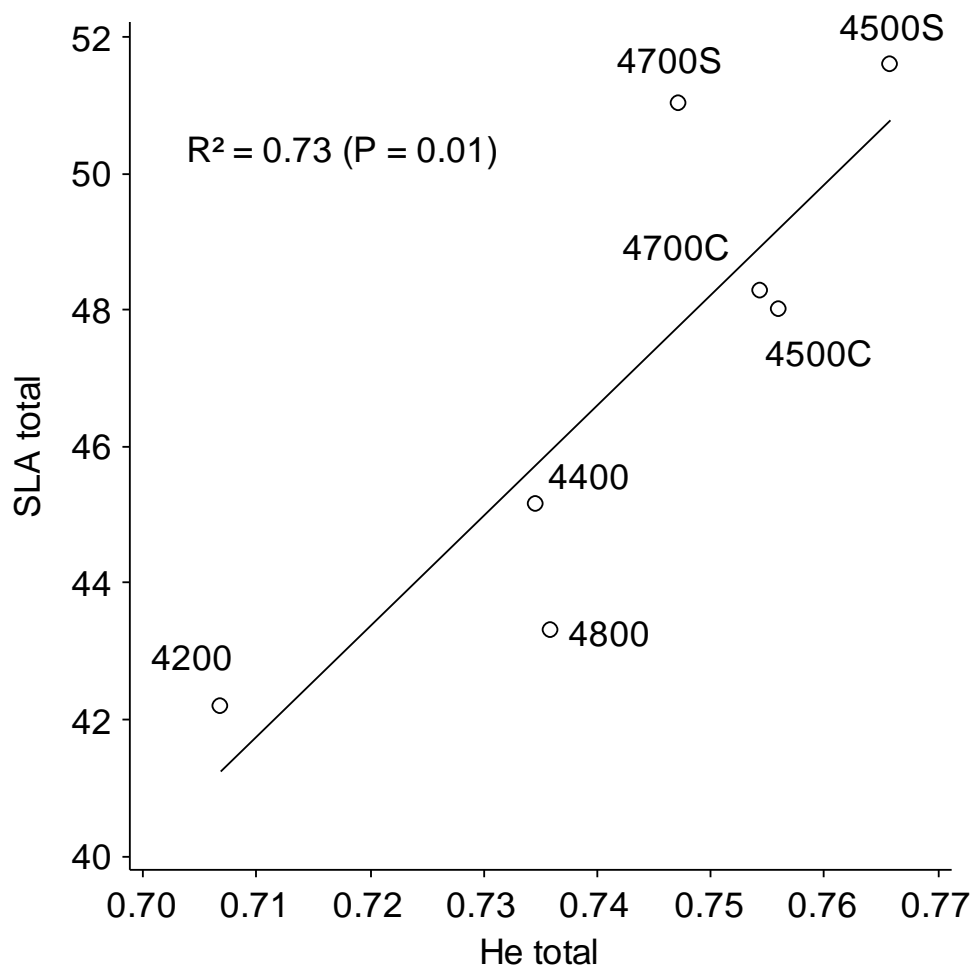


Figura 17. Regresión entre los valores medios de SLA para cada nivel altitudinal (incluyendo los individuos creciendo sobre almohadillas) y el índice de heterocigocidad esperada de cada nivel altitudinal (He).

10. TABLAS

Tabla 1. Primers del género *Senecio* que se transfirieron a *Lasiocephalus ovatus*.

Locus	Aislado a partir de:	Número de acceso al gene Bank	Secuencia del Primer 5'-3'	Motivo de repetición	Tamaño (pb)
S2	<i>S. squalidus</i>	AY652658	F: GCCCTCTGTTTCTCCTCCAA R: TACGCTCTTGAAATGGGTGAC	(A)23- (GT)13	124
S4	<i>S. squalidus</i>	AY652660	F: TGGTCAGTCATGTCGAACCA R: GTTCAGAAAAGAGCATGTATACC	(GT)13- (AG)5	186
S20	<i>S. squalidus</i>	AY652670	F: CTAATAAAAGTCGGGTCACAC R: CTCAAGGGGAAAGGCTCAT	(GT)16	114
S23	<i>S. squalidus</i>	AY652673	F: GAGAATTCGGCTTGGGTGAC R: CGAGGCGCGTGGACTAAC	(GT)23	190
S24	<i>S. squalidus</i>	AY652674	F: AAGTCTTGGCCACATAACCT R: TGCTCCAACATTTTCCTTCATAC	(GT)14- (AG)18	171

Tabla 2. Coctel PCR para amplificación de los microsátélites.

Reactivo	Concentración
Agua destilada estéril	
Buffer para PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs (por cada uno)	200 mM
Primer F	400uM
Primer R	400 uM
Taq Polimerasa	0.6 U/uL
ADN	20 ng/uL

Tabla 3. Datos microclimáticos del gradiente altitudinal.

Sitio	Latitud	Longitud	Temperatura (C°)		Humedad relativa (%)		Velocidad del viento (m/sec)	Cobertura vegetal (%)
			Zona de las hojas	Zona de la raíz	Zona de las hojas	Zona de la raíz		
4200	0°29'37.40"S	78°12'17.72"W	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	92 ± 4 ^a
4400	0°28'02.26"S	78°10'33.43"W	5.45 ± 0.11 ^a	7.43 ± 0.07 ^a	87.09 ± 0.36 ^a	59.38 ± 0.52 ^a	1.49 ± 0.03 ^a	29 ± 6 ^b
4500	0°28'02.87"S	78°10'00.31"W	4.88 ± 0.11 ^b	7.94 ± 0.07 ^b	84.63 ± 0.35 ^b	58.55 ± 1.68 ^a	1.00 ± 0.03 ^b	91 ± 4 ^a
4700	0°28'20.17"S	78°09'30.98"W	4.31 ± 0.10 ^c	6.44 ± 0.09 ^c	79.55 ± 0.35 ^c	38.02 ± 0.48 ^a	1.37 ± 0.04 ^c	27 ± 5 ^b
4800	0°28'22.35"S	78°09'22.74"W	4.17 ± 0.11 ^d	5.14 ± 0.06 ^d	80.81 ± 0.37 ^d	96.74 ± 0.04 ^b	0.42 ± 0.01 ^d	0 ± 0 ^c

Tabla 4. Índices de heterocigocidad esperada (He) de las poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del gradiente altitudinal.

Sitio	He locus 1	He locus 2	He locus 3	He locus 4	He locus 5	He locus 6	He general
4200	0,530697128	0,81054688	0,6366632	0,63683664	0,36316336	0,8328	0,70682205
4400	0,700832527	0,82843137	0,59039795	0,71112077	0,28887923	0,76611111	0,73454464
4500	0,633300781	0,7960761	0,70214844	0,77001953	0,22998047	0,84859295	0,76582297
4700	0,636057569	0,87056213	0,60651974	0,69364196	0,30635804	0,74087771	0,74717558
4800	0,61277775	0,8458642	0,5	0,78875171	0,21124829	0,80166667	0,73589663

Tabla 5. Número de alelos presentes por cada microsatélite (locus) y en total (suma del número de alelos de los 6 loci) para las poblaciones que componen del gradiente altitudinal.

	Locus 1	Locus 2	Locus 3	Locus 4	Locus 5	Locus 6	Total
4200	3	7	3	3	6	12	34
4400	4	9	3	6	10	8	40
4500	5	6	4	7	10	9	41
4700	4	12	4	6	16	8	50
4800	4	10	3	7	9	10	43

Tabla 6. Índices de diversidad genética F_{st} entre poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del gradiente altitudinal.

	4200	4400	4500	4700	4800
4200	0	0,07851379	0,0803423	0,104276	0,08799895
4400	0,07851379	0	0,07272396	0,11285821	0,08799895
4500S	0,0803423	0,07272396	0	0,05909768	0,05640189
4700S	0,104276	0,11285821	0,05909768	0	0,04769048
4800	0,08799895	0,09801483	0,05640189	0,04769048	0

Tabla 7. Distancias geográficas entre poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del gradiente altitudinal. Se utilizaron las coordenadas de cada nivel altitudinal del gradiente para la obtención de la matriz.

	4200	4400	4500	4700	4800
4200	0	0.2813594	.2842844	0.2902725	0.2916405
4400	0.2813594	0	0.01253649	0.02007244	0.02298701
4500	0.2842844	0.01253649	0	0.0082659631	0.003691223
4700	0.2902725	0.02007244	0.0082659631	0	0.002914638
4800	0.2916405	0.02298701	0.0110594610	0.002914638	0

Tabla 8. Tabla de distancias microclimáticas entre poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del gradiente altitudinal. Se utilizaron los datos microclimáticos mencionados en la tabla 3 para la obtención de esta matriz.

	4400	4500	4700	4800
4400	0	2.750564	22.702319	37.989938
4500	2.750564	0	21.213182	38.493493
4700	22.702319	21.213182	0	58.75575
4800	37.989938	38.493493	58.75575	0

Tabla 9. Tabla de distancias usando los nutrientes del suelo de las poblaciones de *Lasiocephalus ovatus* del gradiente altitudinal. Se utilizó la media (por cada nivel altitudinal) de los principales nutrientes del suelo (Nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio) para la obtención de esta matriz.

	4200	4400	4500	4700	4800
4200	0	57.643	20.205	32.421	67.006
4400	57.643	0	77.726	25.224	9.470
4500	20.205	77.726	0	52.538	871.268
4700	32.421	25.224	52.538	0	345.917
4800	67.006	9.470	871.268	345.917	0

12. ANEXOS

Anexo1. *Lasiocephalus ovatus*. Fotografía tomada a 4200m. En el primer nivel del gradiente altitudinal. Nótese la robustés de las hojas de este sitio.



Anexo 2. Metodología para el análisis de suelos. Utilizada en el laboratorio de suelos, plantas y aguas de INIAP-Estación experimental Santa Catalina. Fuente: Hunter, 1978.

Característica	Unidad	Metodología de extracción	Determinación
N	%	Digestión Kjeldhal-Bloque	Determinación volumétrica
P	%	Digestión ácida vía húmeda-Plancha	Colorimetría Metavanadato y molibdato de amonio
K, Mg, Ca	%		Espectrometría de absorción atómica
S	%		Espectrometría de absorción atómica
B	ppm		Colorimétrica Curcumina
Zn-Mn-Fe-Cu	ppm		Espectrometría de absorción atómica
Materia Seca	%		Gravimétrica
Materia Orgánica	%		Perdida por calcinación

Anexo 3. Protocolo para el cálculo de la cobertura vegetal usando el software ImageG[®].

1. Definición de la escala:

Analyze >

Set scale : ingresar el numero de píxeles correspondiendo al objeto de referencia en la imagen, ingresar el tamaño real del objeto, y la unidad.

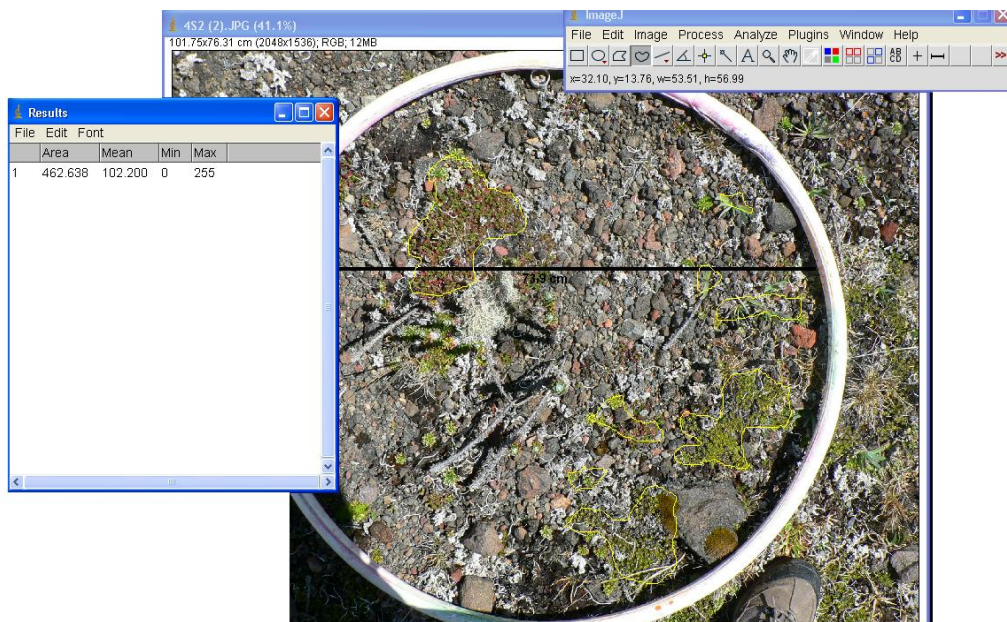
2. Selección de la área:

Barra de herramientas > « *Free hand selections* » : selecciona las áreas de cobertura vegetal.

Aplastando en el teclado Shift, selecciona nuevas áreas de cobertura

3. Calculo :

Analyze > *Measure* : los resultados salen en la ventana « *Results* », la unidad es la definida en la escala (cm²).



Anexo 4. Medición y marcaje de individuos de *Lasiocephalus ovatus* en el sitio 4200

a) Individuos de *Lasiocephalus ovatus* dentro del sitio 4200. b) Medición de un individuo de *Lasiocephalus ovatus*.

a)



b)



Anexo 5. Protocolo para el cálculo del área de las hojas usando el software ImageG[®].

1. Preparación de la imagen:

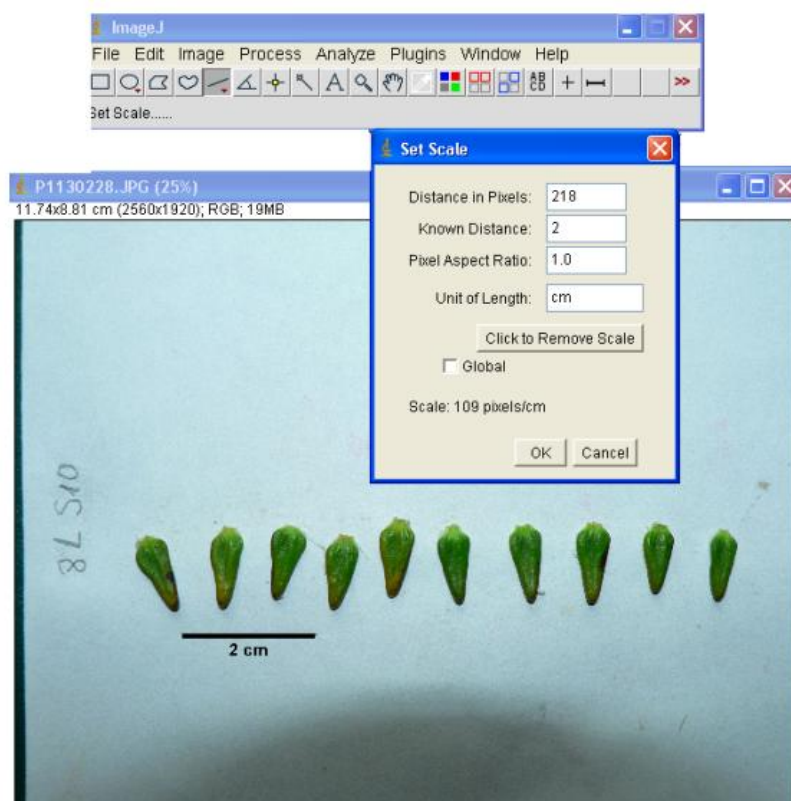
Image > Type > 8 bit

Process > Binary > Make binary: ahí la imagen sale en blanco y negro.

File > Save as > JPEG > nombre del archivo y dirección donde guardarlo

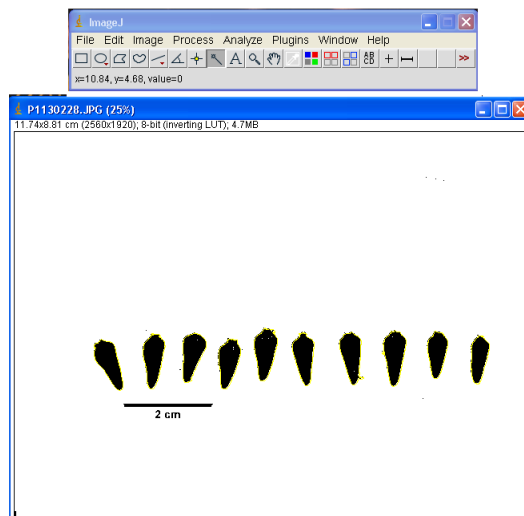
2. Definición de la escala:

Analyze > Set scale : ingresar el numero de píxeles correspondiendo al objeto de referencia en la imagen, ingresar el tamaño real del objeto, y la unidad.



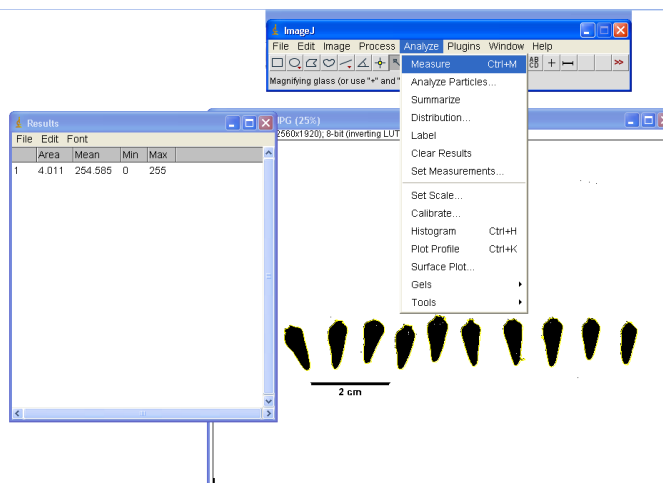
3. Selección de la área:

Barra de herramientas > « *Wand tool* » : selecciona los píxeles de un mismo color.
Aplastando el teclado Shift, clicar acerca de cada hoja para seleccionarla.



4. Calculo del área :

Analyze > *Measure* : los resultados salen en la ventana « *Results* », la unidad es la definida en la escala (cm²).



Anexo 6. Metodología para el análisis foliar utilizada en el laboratorio de suelos, plantas y aguas de INIAP-Estación experimental Santa Catalina. Fuente: Hunter, 1978.

Característica	Unidad	Metodología de extracción	Determinación
N	%	Digestión Kjeldhal-Bloque	Determinación volumétrica
P	%	Digestión ácida vía húmeda-Plancha	Colorimetría Metavanadato y molibdato de amonio
K, Mg, Ca	%		Espectrometría de absorción atómica
S	%		Espectrometría de absorción atómica
B	ppm		Colorimétrica Curcumina
Zn-Mn-Fe-Cu	ppm		Espectrometría de absorción atómica
Materia Seca	%		Gravimétrica
Materia Orgánica	%		Perdida por calcinación

Anexo 7. a) *Azorella aretioides*. Foto tomada en el sitio 4500. b) *Lasiocephalus ovatus* sobre una almohadilla de *Azorella aretioides*. Foto tomada en el sitio 4500.

a)



b)



DECLARACIÓN y AUTORIZACIÓN

Yo, Juan Pablo Almeida Vaca, CI 1710313022, autor del trabajo de graduación titulado: “Mecanismos de colonización de *Lasiocephalus ovatus* Schltdl. (Asteraceae) en el superpáramo del Antisana. Plasticidad fenotípica, estructura genética e interacciones con otras especies” previa a la obtención del grado académico de **LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en la **Facultad de Ciencias exactas y Naturales**:

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

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

Quito, 29 de junio del 2011.

Sr. Juan Pablo Almeida Vaca.

CI 1710313022