

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Análisis filogenéticos y morfométricos del género *Hesperomeles* Lindl. (Rosaceae) en el  
Ecuador

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

ALEJANDRA OFELIA PONCE TORRES

Quito, 2015

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas de la candidata Alejandra Ofelia Ponce Torres ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente

Katya Romoleroux Ph.D

Directora de Disertación

20 de mayo de 2015

*Dedico este trabajo a mis hijos Tomás y José Daniel*

*por enseñarme a luchar.*

*A mis padres y a mi esposo*

*por su amor y apoyo incondicional.*

## TABLA DE CONTENIDOS

|                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <a href="#"><u>LISTA DE TABLAS</u></a> .....                                      | vii |
| <a href="#"><u>RESUMEN</u></a> .....                                              | 8   |
| <a href="#"><u>ABSTRACT</u></a> .....                                             | 9   |
| <a href="#"><u>INTRODUCCIÓN</u></a> .....                                         | 10  |
| <a href="#"><u>MATERIALES Y METODOS</u></a> .....                                 | 13  |
| <a href="#"><u>Área de estudio y recolección de muestras</u></a> .....            | 13  |
| <a href="#"><u>Análisis Morfométricos</u></a> .....                               | 14  |
| <a href="#"><u>Análisis filogenéticos</u></a> .....                               | 15  |
| <a href="#"><u>RESULTADOS</u></a> .....                                           | 17  |
| <a href="#"><u>Análisis Morfométricos</u></a> .....                               | 17  |
| <a href="#"><u>Análisis filogenéticos</u></a> .....                               | 22  |
| <a href="#"><u>Espaciador Interno Transcrito de ADN Ribosomal (ITS)</u></a> ..... | 22  |
| <a href="#"><u>Espaciadores Intergénicos Cloroplásticos TRNL/TRNF</u></a> .....   | 23  |
| <a href="#"><u>DISCUSIÓN</u></a> .....                                            | 26  |
| <a href="#"><u>Análisis morfométricos</u></a> .....                               | 26  |
| <a href="#"><u>Relaciones evolutivas dentro de <i>Hesperomeles</i></u></a> .....  | 27  |
| <a href="#"><u>AGRADECIMIENTOS</u></a> .....                                      | 30  |
| <a href="#"><u>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></a> .....                           | 31  |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b><u>Figura 1.</u></b> <u>Las especies del genero <i>Hesperomeles</i> en el Ecuador.</u> .....                                                                                                                                     | 12 |
| <b><u>Figura 2.-</u></b> <u>Topología del árbol generado mediante el análisis de conglomerados jerárquicos.</u> .....                                                                                                               | 18 |
| <b><u>Figura 3.-</u></b> <u>Análisis de conglomerados jerárquicos, donde se puede observar la clasificación de las muestras por análisis morfométricos dentro del grupo de <i>H. obtusifolia</i> var. <i>microphylla</i>.</u> ..... | 20 |
| <b><u>Figura 4.-</u></b> <u>Análisis de conglomerados jerárquicos, donde se puede observar la clasificación de las muestras por análisis morfométricos dentro del grupo de <i>H. obtusifolia</i> var. <i>obtusifolia</i>.</u> ..... | 21 |
| <b><u>Figura 5.</u></b> <u>Diagrama de dispersión donde se muestra la relación de los grupos de <i>Hesperomeles</i> con las funciones canónicas discriminantes.</u> .....                                                           | 22 |
| <b><u>Figura 6.</u></b> <u>Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de la región ITS.</u> .....                                                                                                 | 24 |
| <b><u>Figura 7.</u></b> <u>Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de la región TRNL/TRNF.</u> .....                                                                                           | 25 |

## LISTA DE TABLAS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <u>Tabla 1. Caracteres morfológicos vegetativos utilizados como variables cualitativas en los análisis morfométricos.....</u> | 14 |
| <u>Tabla 2. Características principales de los grupos de <i>Hesperomeles</i> analizados morfométricamente.....</u>            | 19 |

**Análisis filogenéticos y morfométricos del género *Hesperomeles* Lindl.  
(Rosaceae) en el Ecuador.**  
**Alejandra Ponce-Torres**

Laboratorio de Sistemática Botánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. [kromoleroux@puce.edu.ec](mailto:kromoleroux@puce.edu.ec)

**RESUMEN**

El género *Hesperomeles* pertenece a la familia Rosaceae, subtribu Pyrinae; en los Andes ecuatorianos se han reportado dos especies: *Hesperomeles ferruginea* y *Hesperomeles obtusifolia*, además a esta última especie se la ha dividido en dos variedades *H. obtusifolia* var. *microphylla* y *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*, las cuales se diferencian principalmente por el tamaño y forma de sus hojas. La taxonomía de *Hesperomeles* y su relación con los otros géneros de Pyrinae es pobremente entendida. En este estudio se realizaron análisis morfométricos y genéticos de individuos colectados a lo largo de los Andes ecuatorianos, para esclarecer las relaciones evolutivas y los caracteres morfológicos principales que diferencian las variedades y especies del Ecuador. Dentro de los análisis morfométricos se realizaron conglomerados jerárquicos y discriminantes, mientras que para los análisis moleculares se realizaron inferencias de máxima parsimonia de las regiones ITS1/ITS4 y TRNL/TRNF. Los resultados obtenidos de los análisis morfométricos corroboran la clasificación propuesta anteriormente para el género en el Ecuador, mientras que los análisis genéticos no muestran diferenciación entre especies debido a la poca variabilidad de las secuencias analizadas, esto probablemente se debe a la rápida y reciente radiación del género y la subtribu Pyrinae.

**PALABRAS CLAVE**

Andes, Ecuador, Filogenia, *Hesperomeles*, ITS1/ITS4, Morfometría y TRNL/F.

## ABSTRACT

The genus *Hesperomeles* belongs to Rosaceae family, subtribe Pyrinae; in the Ecuadorian Andes two species have been reported: *Hesperomeles ferruginea* and *Hesperomeles obtusifolia* furthermore this last species have been divided in two varieties *H. obtusifolia* var. *microphylla* and *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*. Separation of species has been based on leaf characters like size and shape. The taxonomy of *Hesperomeles* and his relationship with other genera of Pyrinae is poorly understood. In this study morphometric and genetic analysis were conducted of individuals collected along the Ecuadorian Andes, to clarify the evolutionary relationships and key morphological characters that distinguish the varieties and species of Ecuador. Within the morphometric analysis we execute hierarchical clustering and discriminant analysis, whereas for the molecular analysis we execute maximum parsimony inferences from the ITS1/ITS4 and TRNL/TRNF region. The results of the morphometric analysis support the classification proposed for the genus in Ecuador, while genetic analysis show no differentiation between species due to the low variability of the sequences analyzed, this is probably because of the recent radiation of the genus and of the subtribe Pyrinae.

## KEY WORDS

Andes, Ecuador, *Hesperomeles*, ITS1/ITS4, Morphometry, Phylogeny and TRNL/F.

## INTRODUCCIÓN

*Hesperomeles* Lindl. es un género Neotropical de la familia Rosaceae, subfamilia Spiraeoideae, subtribu Pyrinae (Potter *et al.*, 2007). Se distribuye en los Andes de Sudamérica y en las regiones montañosas de Panamá y Costa Rica usualmente entre los 2000 y los 4200 msnm (Romoleroux, 1996). Se han descrito 20 especies (Romoleroux, 1996; McVaugh, 1950) de las cuales 11 son endémicas de los Andes de Sudamérica (Li *et al.*, 2012).

Las especies de *Hesperomeles* son árboles o arbustos muy enramados, en algunas especies las ramas están modificadas en una espina terminal. Presentan hojas alternas y simples con márgenes usualmente aserrados y estípulas. Flores bracteadas, pentámeras, agrupadas en una cima terminal o flores solitarias. Su fruto es un pomo globoso rojo a negro con cinco pirenos muy duros (Romoleroux, 1996; Robertson *et al.* 1991; Romoleroux, 1989; McVaugh, 1950).

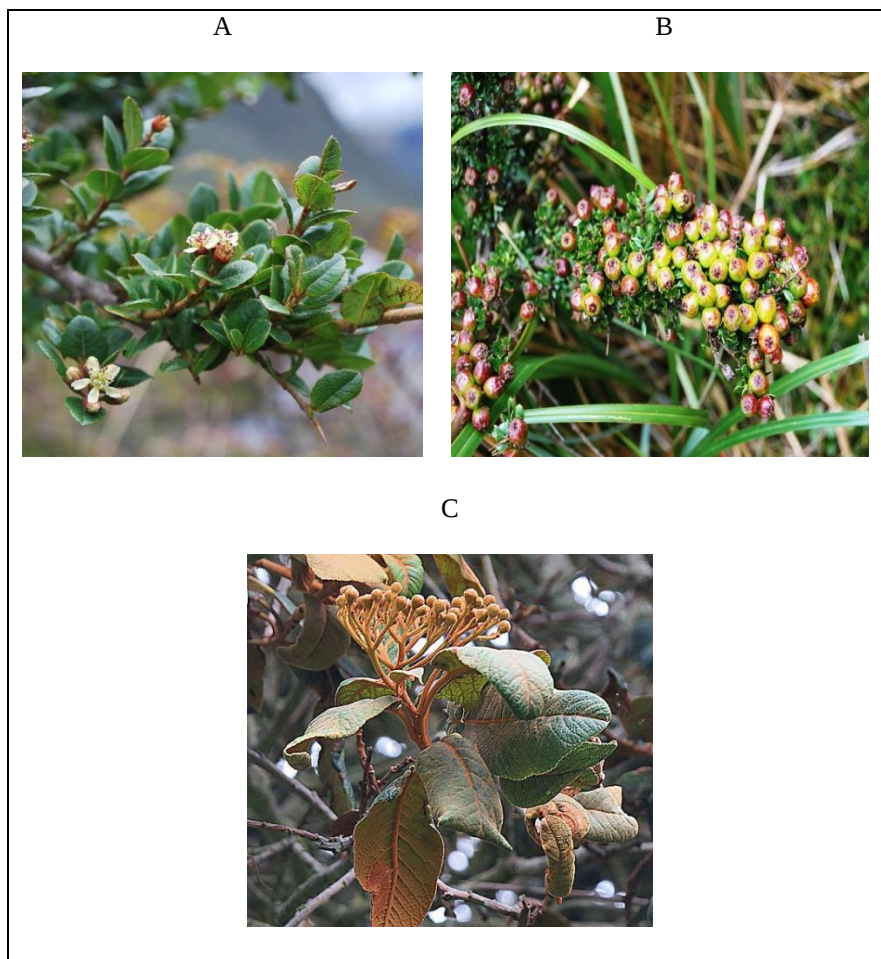
Su clasificación se ha realizado principalmente en base a caracteres de las hojas, como tamaño y forma (McVaugh, 1950), aunque se ha podido observar que estos caracteres así como los patrones de venación, el tamaño de la inflorescencia y de las flores, varían frecuentemente dentro de una misma planta o entre ellas, presentando así una amplia plasticidad dentro de una misma especie (Romoleroux, 1996).

Varias especies de *Hesperomeles* han sido incluidas dentro del género *Osteomeles* Lindl. ya que comparten el óvulo solitario y los pirenos duros (Rohrer *et al.*, 1991), sin embargo por las hojas simples y las inflorescencias reducidas presentes en *Hesperomeles*, Robertson *et al.* (1991) consideran que deben ser separados en géneros distintos. En cuanto a su

distribución *Osteomeles* se encuentra en Asia y Hawai, mientras que *Hesperomeles* es un género exclusivo de Sudamérica y Centroamérica (Sterling, 1964). Li *et al.* (2012) en su análisis molecular sugieren que *Hesperomeles* está distantemente relacionado con *Osteomeles* y, aunque con poca resolución, se encontró que *Hesperomeles* es un género hermano del clado *Crataegus* L.-*Mespilus* L. Los tres géneros comparten características morfológicas como las hojas simples, posible presencia de espinos y pirenos duros. La mayoría de especies de *Crataegus* están distribuidas en Norte América pero *Crataegus mexicana* DC. se encuentra también en Guatemala mientras que, *Hesperomeles obovata* (Pittier) Standl. y *Hesperomeles heterophylla* (Ruiz. & Pav.) Hook. pueden ser encontradas en Costa Rica, por esta distribución de los dos géneros se sugiere que *Hesperomeles* pudo originarse de *Crataegus mexicana* o de un pariente extinto (Phipps *et al.*, 1983).

La relación de *Hesperomeles* con los otros géneros de Pyrinae es pobremente entendida (Campbell *et al.*, 2007). Además varios estudios moleculares de Rosaceae y de Pyrinae no han incluido secuencias del género en sus filogenias (Campbell *et al.*, 2007; Potter *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1995).

Según Romoleroux (1996), se registran dos especies en el Ecuador: *Hesperomeles ferruginea* (Pers.) Benth. y *Hesperomeles obtusifolia* (Pers.) Lindl. (Figura 1), dichas especies se diferencian principalmente por la pubescencia ya que *Hesperomeles obtusifolia* es casi glabra mientras que *Hesperomeles ferruginea* tiene hojas e inflorescencias panosas de color ferrugineo. Además *Hesperomeles obtusifolia* forma arbustos con ramas espinosas y *Hesperomeles ferruginea* forma árboles sin espinas (Romoleroux, 1996).



**Figura 1.** Especies del género *Hesperomeles* en el Ecuador. A. *Hesperomeles obtusifolia* var. *obtusifolia*, B. *Hesperomeles obtusifolia* var. *Microphylla*, C. *Hesperomeles ferruginea*.

Dentro de *Hesperomeles obtusifolia* se ha descrito un complejo de especies, las cuales en el tratamiento de la Flora del Ecuador se han agrupado en dos variedades: *Hesperomeles obtusifolia* var. *obtusifolia* y *Hesperomeles obtusifolia* var. *microphylla* (Wedd.) Romoleroux, dichas variedades se diferencian principalmente en el tamaño, forma, margen de las hojas y en el tamaño de los peciolo y de los pedúnculos (Romoleroux, 1996).

Las especies ecuatorianas de *Hesperomeles* son utilizadas en varios aspectos como: alimento por su fruto comestible, maderables, medicinales, forestales por su potencial para

reforestación y como alimento de vertebrados como el oso andino (De la Torre *et al.*, 2008; Troya *et al.*, 2004).

El presente estudio pretende resolver la taxonomía de *Hesperomeles* en el Ecuador y probar si los caracteres moleculares soportan lo propuesto por Romoleroux (1996) para las especies y variedades del género, además complementar la investigación con análisis morfométricos para la delimitación de especies.

## **MATERIALES Y METODOS**

### **Área de estudio y recolección de muestras**

El estudio se llevó a cabo en los Andes ecuatorianos, en las provincias donde se encontraron registradas el mayor número de colecciones del Herbario QCA. El género *Hesperomeles* se encuentra distribuido en los ecosistemas bosque montano alto y de páramo (Sklenář *et al.*, 2005; Cerón *et al.*, 1999).

En total se colectaron y evaluaron 140 muestras botánicas, en varias localidades de las provincias de los Andes ecuatorianos, con excepción de Cotopaxi. De todo el material se preservaron varias hojas en sílica-gel para su posterior uso en las extracciones de ADN.

Las muestras fueron identificadas en el Herbario QCA de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, bajo la clave propuesta por Romoleroux, (1996), obteniendo 23 muestras de *H. ferruginea*, 58 de *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*, 21 de *H. obtusifolia* var. *microphylla*, 29 muestras fueron clasificadas como *H. obtusifolia* hasta encasillarlas dentro de alguna variedad, con los posteriores análisis, al igual que a 9 muestras de *Hesperomeles* sp. A estas muestras se las nombró momentáneamente como problema.

### Análisis Morfométricos

Se utilizaron caracteres vegetativos medibles como el largo del peciolo y de la lámina y el ancho de la parte intermedia de la lámina, estas medidas se realizaron en cinco hojas maduras de cada muestra, con lo que se obtuvieron los valores de la media, desviación estándar, máximos y mínimos de cada variable por individuo, además se analizaron caracteres vegetativos cualitativos descritos en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Caracteres morfológicos vegetativos utilizados como variables cualitativas en los análisis morfométricos.

| Variable                   | Descripción                             | Tipo de variable | Categorías                                                         |
|----------------------------|-----------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Hábito</b>              | Tipo de hábito                          | Categórica       | Árbol o arbusto                                                    |
| <b>Pubescencia rama</b>    | Intensidad de pubescencia en la rama    | Categórica       | Ausente, escasa o abundante                                        |
| <b>Color pub. rama</b>     | Color de pubescencia en la rama         | Categórica       | Ausente, blanca o ferruginea                                       |
| <b>Pubescencia peciolo</b> | Intensidad de pubescencia en el peciolo | Categórica       | Ausente, escasa o abundante                                        |
| <b>Color pub. peciolo</b>  | Color de pubescencia en el peciolo      | Categórica       | Ausente, blanca o ferruginea                                       |
| <b>Pubescencia hoja</b>    | Intensidad de pubescencia en la hoja    | Categórica       | Ausente, escasa o abundante                                        |
| <b>Color pub. hoja</b>     | Color de pubescencia en la hoja         | Categórica       | Ausente, blanca o ferruginea                                       |
| <b>Espina</b>              | Ramas modificadas en espinas terminales | Categórica       | Ausente o presente                                                 |
| <b>Forma hoja</b>          | Forma de la lámina                      | Categórica       | Oblonga, ovada o elíptica                                          |
| <b>Ápice</b>               | Tipo de ápice de la hoja                | Categórica       | Agudo u obtuso                                                     |
| <b>Margen hoja</b>         | Tipo de margen de la hoja               | Categórica       | Crenado, aserrado, crenado hacia la punta, aserrado hacia la punta |

El análisis de los datos se lo realizó en el software estadístico PASW Statistics 18. Mediante un Análisis de Componentes Principales (PCA) con rotación Varimax se sintetizó la información proveniente de las variables cuantitativas de las hojas.

Las puntuaciones factoriales obtenidas de este análisis fueron incluidas en la matriz de datos y analizadas conjuntamente con las variables cualitativas categóricas, con la finalidad de clasificar a las muestras mediante un análisis de Conglomerados Jerárquicos, bajo el método de vinculación intra-grupos, a partir de una matriz de distancias euclidianas.

Según la clasificación obtenida por el análisis de conglomerados se dio una nueva determinación a las muestras, generando tres grupos, con éstos se procedió a realizar un análisis discriminante para corroborar la pertenencia de cada muestra al grupo indicado e identificar las variables que más contribuyen a la diferenciación entre grupos.

### **Análisis filogenéticos**

Se maceraron las hojas conservadas en sílica-gel en un mortero hasta obtener un polvo fino para después realizar la extracción de ADN total usando el protocolo de extracción con CTAB y Cloroformo Isoamyl-Alcohol modificado de Doyle y Doyle 1987 (Cullings, 1992; Doyle y Dickson, 1987; Doyle y Doyle, 1987).

Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se usó una región del cloroplasto: TRNL/TRNF y una región del ADN nuclear ribosómico: ITS1/ITS2. Las secuencias de los cebadores utilizados fueron las siguientes: ITS 1 (GTCCACTGAACCTTATCATTTAG), ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), TRNL (GAAATCGGTAGACGCTACG) y TRNF (ATTTGAACTGGTGACACGAG).

Los PCR fueron llevados a cabo en un volumen final de reacción de 60 µl que contenía: 6µl de buffer de PCR 10X, 3.6µl de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 1.2µl de dNTP mix 10mM (Promega), 2.4µl de cada cebador 10uM, 1 unidad (0.2 µl) de Platinum Taq polimerasa (Invitrogen), 2µl de ADN y agua ultrapura para completar al volumen final.

El programa de amplificación fue de 2 minutos a 95°C para la denaturación inicial, 30 ciclos de: 45 segundos a 94°C para denaturación, 45 segundos a 55°C para ITS y a 50°C para TRNL/F para el anillamiento y 45 segundos a 72°C para la extensión, el programa concluyó con 5 minutos a 72°C para la extensión final. Para evidenciar los resultados de las extracciones de ADN y de los PCRs, se corrieron las muestras durante 1 hora a 120V en un gel de agarosa al 1%. Finalmente se enviaron 96 muestras de los productos amplificados, de ITS1/ITS4 y TRNL/TRNF, al laboratorio comercial MACROGEN Corea, para su purificación y secuenciamiento.

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas, editadas y alineadas en el programa Geneious 7.0.6 (<http://www.geneious.com>, Kearse *et al.*, 2012) en conjunto con la extensión del software MAFFT Vr. 7.017 (Katoh *et al.*, 2002).

Los análisis de máxima parsimonia (MP) se llevaron a cabo en MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013). Se realizaron búsquedas heurísticas con el algoritmo de barrido de ramas (branchswapping) por bisección y reconexión del árbol (tree-bisection-reconnection: TBR) con adición aleatoria al árbol inicial de 1000 réplicas, con igual peso para todos los caracteres (Broughton *et al.*, 2000). Se evaluó el soporte de los nodos por medio del método de 'bootstrap' no-paramétrico (BS) (Felsenstein, 1985) usando 1000 réplicas con búsquedas heurísticas y conservando el mejor árbol por cada réplica. Se obtuvo un árbol consenso con

regla de mayoría al 50% y se obtuvieron los índices de consistencia (CI) y retención (RI) como medida de la homoplasia presentada en los conjuntos de datos.

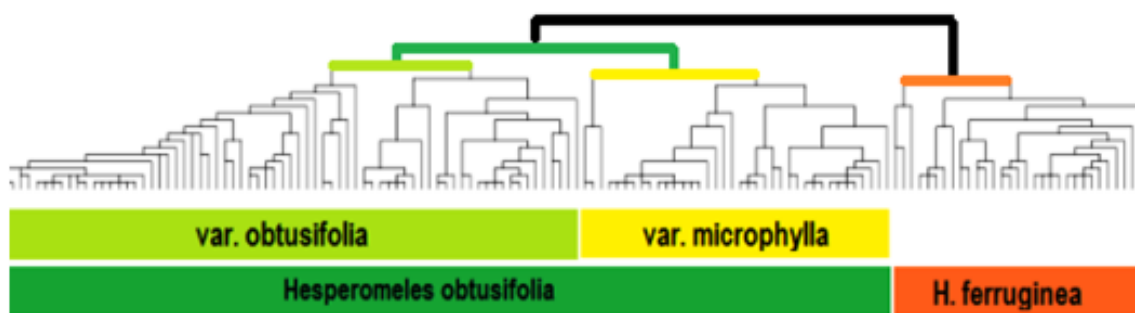
## RESULTADOS

### Análisis Morfométricos

El análisis de componentes principales (PCA), redujo las variables cuantitativas a dos componentes que explican el 86% de la variación total de los resultados. El componente uno explica el 76% de la variación inicial y está relacionado con las medidas del largo de la hoja (pecíolo y lámina), mientras que el segundo componente explica el 10% de la variación inicial y se encuentra relacionado a medidas del ancho de lámina foliar.

Mediante el análisis de conglomerados jerárquicos se obtuvieron tres grupos claramente diferenciados (Figura 2): un grupo identificado como *H. ferruginea* y otro identificado como *H. obtusifolia* que se divide en dos grupos correspondientes a los especímenes identificados como *H. obtusifolia* var. *microphylla* (Figura 3) y *H. obtusifolia* var. *obtusifolia* (Figura 4). Este análisis permitió reclasificar las muestras de la siguiente manera: 31 corresponden a *H. ferruginea*, 38 a *H. obtusifolia* var. *microphylla* y 71 a *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*.

Las muestras identificadas inicialmente como problema fueron ubicadas por el programa de la siguiente forma: 13 como *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*, 16 como *H. obtusifolia* var. *microphylla* y 9 como *H. ferruginea*.



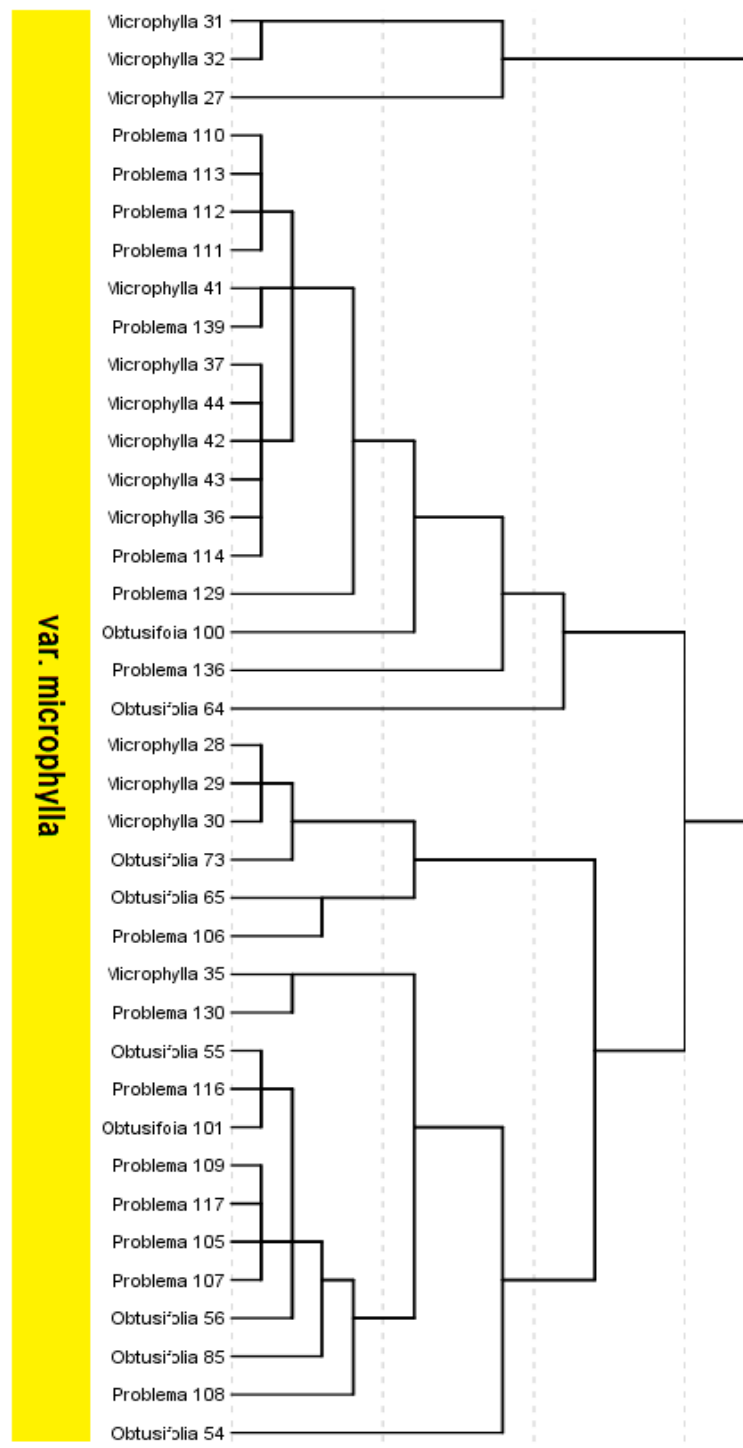
**Figura 2.-** Topología del árbol generado mediante el análisis de conglomerados jerárquicos. Se evidencia que *H. ferruginea* se separa de *H. obtusifolia* y además esta especie se divide en dos grupos correspondientes a cada una de sus variedades.

El análisis discriminante clasifica al 98, 6% de los casos de igual manera que el análisis de conglomerados, con solo dos muestras reclasificadas. Además se extrajeron dos funciones canónicas discriminantes de las cuales la primera explica el 66% de varianza y tiene mayor relación con el tipo de margen, el color de la pubescencia y el largo y ancho de la hoja. Mientras que la segunda función explica el 34% de varianza y se relaciona con la pubescencia y forma de la hoja y la presencia o ausencia de espinas terminales.

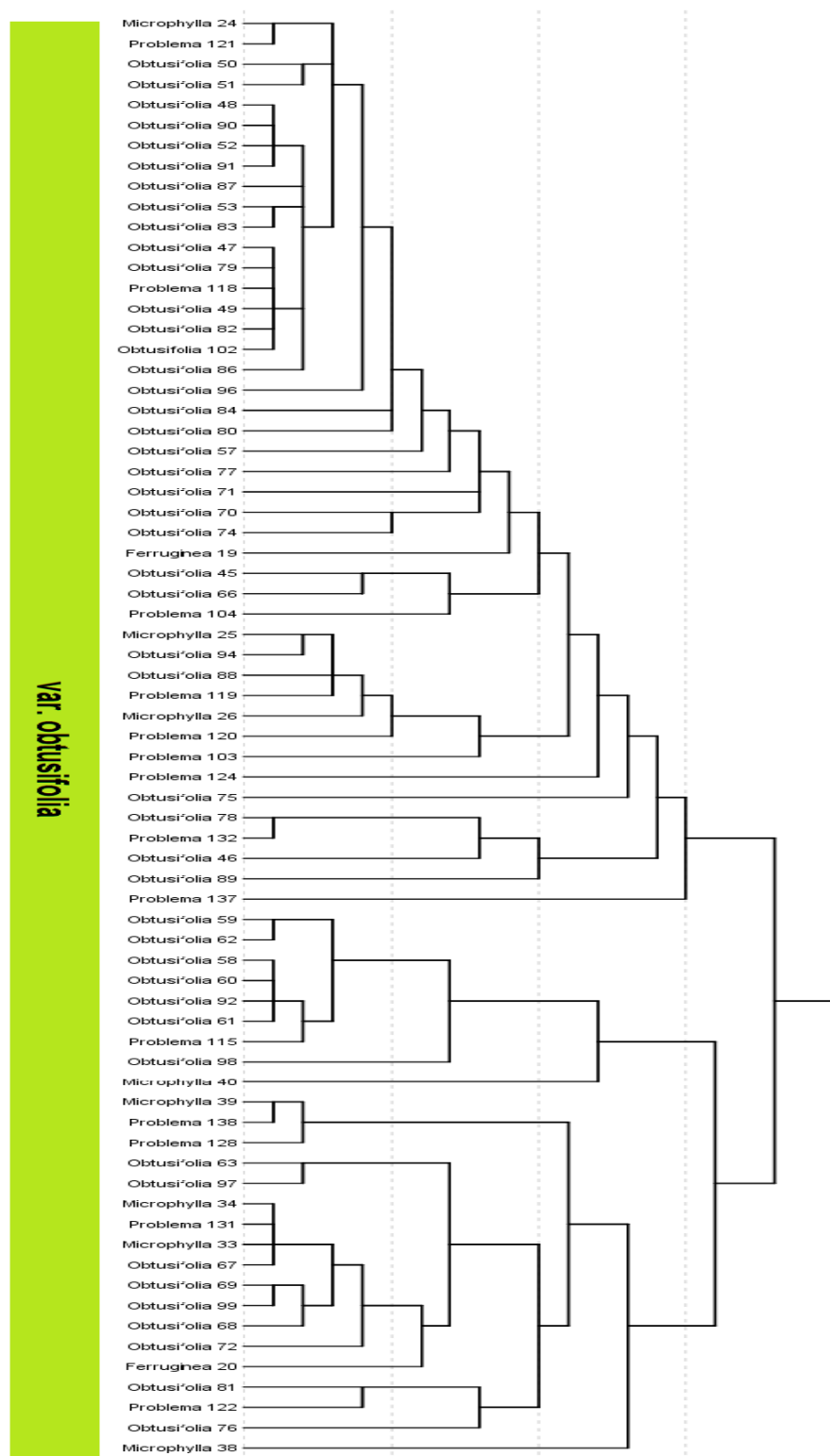
En la figura 5 se puede observar como los grupos se relacionan con las funciones canónicas discriminantes. El grupo de *H. ferruginea* está más relacionado con la función dos lo cual indica que la presencia de espinas y la forma y pubescencia de las hojas son las variables determinantes para separarlo de *H. obtusifolia*, mientras que las variedades *H. obtusifolia* están relacionadas con la función uno, por esto el tipo de margen y el largo y ancho de la hoja son las variables principales para diferenciar estos grupos. Las principales características que describen a cada especie y variedad se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características principales de los grupos de *Hesperomeles* analizados morfométricamente. Las medidas de las variables cuantitativas corresponden al valor máximo y mínimo y el promedio con su respectiva variación en paréntesis. En la variables cualitativas las abreviaciones expresan lo siguiente: OV=Ovada, OB=Oblonga, EL=Elíptica, C=Crenado, CP=Crenado en la punta, A=Aserrado, B=Blanco y F=Ferruginoso

| Caracteres                       | H. obtusifolia                           | H. obtusifolia var. obtusifolia          | H. obtusifolia var. microphylla          | H. ferruginea     |
|----------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|
| <b>Tamaño del peciolo (cm)</b>   | 0-(0.2±0.1)-1.2                          | 0.1-(0.3±0.1)-1.2                        | 0-(0.2±0.1)-0.6                          | 0.2-(0.6±0.1)-1.3 |
| <b>Tamaño de la lámina (cm)</b>  | 0.4-(1.8±0.3)-7.5                        | 0.7-(2±0.3)-7.5                          | 0.4-(1.3±0.2)-2.9                        | 1.4-(4.1±0.6)-7.6 |
| <b>Ancho de la lámina (cm)</b>   | 0.2-(1.1±0.2)-4                          | 0.2-(1.3±0.2)-4                          | 0.2-(0.7±0.1)-1.8                        | 0.8-(2.1±0.4)-4.6 |
| <b>Hábito</b>                    | Generalmente arbustos, raramente árboles | Generalmente arbustos, raramente árboles | Generalmente arbustos, raramente árboles | Siempre árboles   |
| <b>Forma de la lámina</b>        | EL, OV y/o OB                            | Usualmente EL y/o OV                     | Usualmente EL y/o OB                     | Siempre EL        |
| <b>Forma del ápice</b>           | AG y OBT                                 | Usualmente AG y/o OBT                    | Usualmente AG y/o OBT                    | Siempre OBT       |
| <b>Margen de la lámina</b>       | Usualmente C o CP                        | Usualmente C                             | Usualmente CP                            | Usualmente A      |
| <b>Pubescencia en la rama</b>    | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Abundante (F)     |
| <b>Pubescencia en el peciolo</b> | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Abundante (F)     |
| <b>Pubescencia en la lámina</b>  | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Ausente o Escasa (B o F)                 | Abundante (F)     |
| <b>Espinos</b>                   | Presentes                                | Presentes                                | Presentes                                | Ausentes          |



**Figura 3.-** Análisis de conglomerados jerárquicos, donde se puede observar la clasificación de las muestras por análisis morfométricos dentro del grupo de *H. obtusifolia* var. *microphylla*.

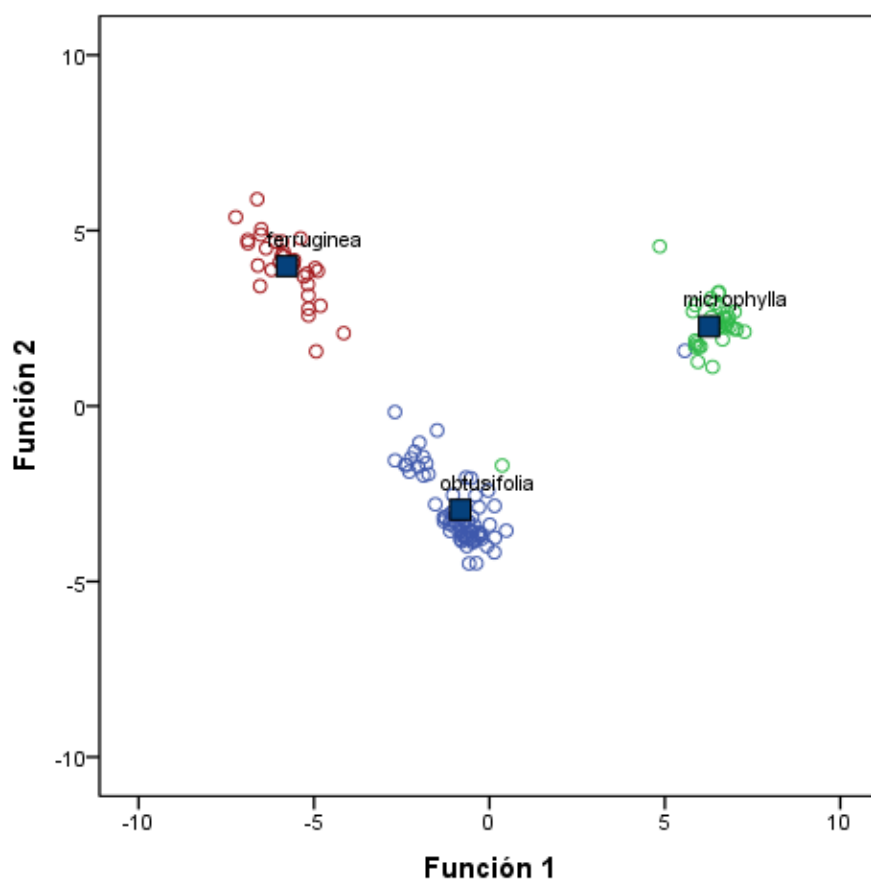


**Figura 4.-** Análisis de conglomerados jerárquicos, donde se puede observar la clasificación de las muestras por análisis morfométricos dentro del grupo de *H. obtusifolia* var. *obtusifolia*.

## Análisis filogenéticos

### Espaciador Interno Transcrito de ADN Ribosomal (ITS)

Se obtuvo las secuencias de 79 individuos, incluyendo una de *Malus kansuensis* (Batalin) C.K. Schneid. que fue utilizada como grupo externo, con lo cual se elaboró la matriz final de alineamiento, ésta incluyó 601 caracteres, de los cuales 512 (85%) fueron conservados, 83 (13%) variables y 52 (8%) fueron parsimónicamente informativos. La búsqueda de máxima parsimonia resultó en 12 árboles parsimónicos con una longitud de 159 pasos y un índice de consistencia (CI) de 0.48 y un índice de retención (RI) de 0.88.



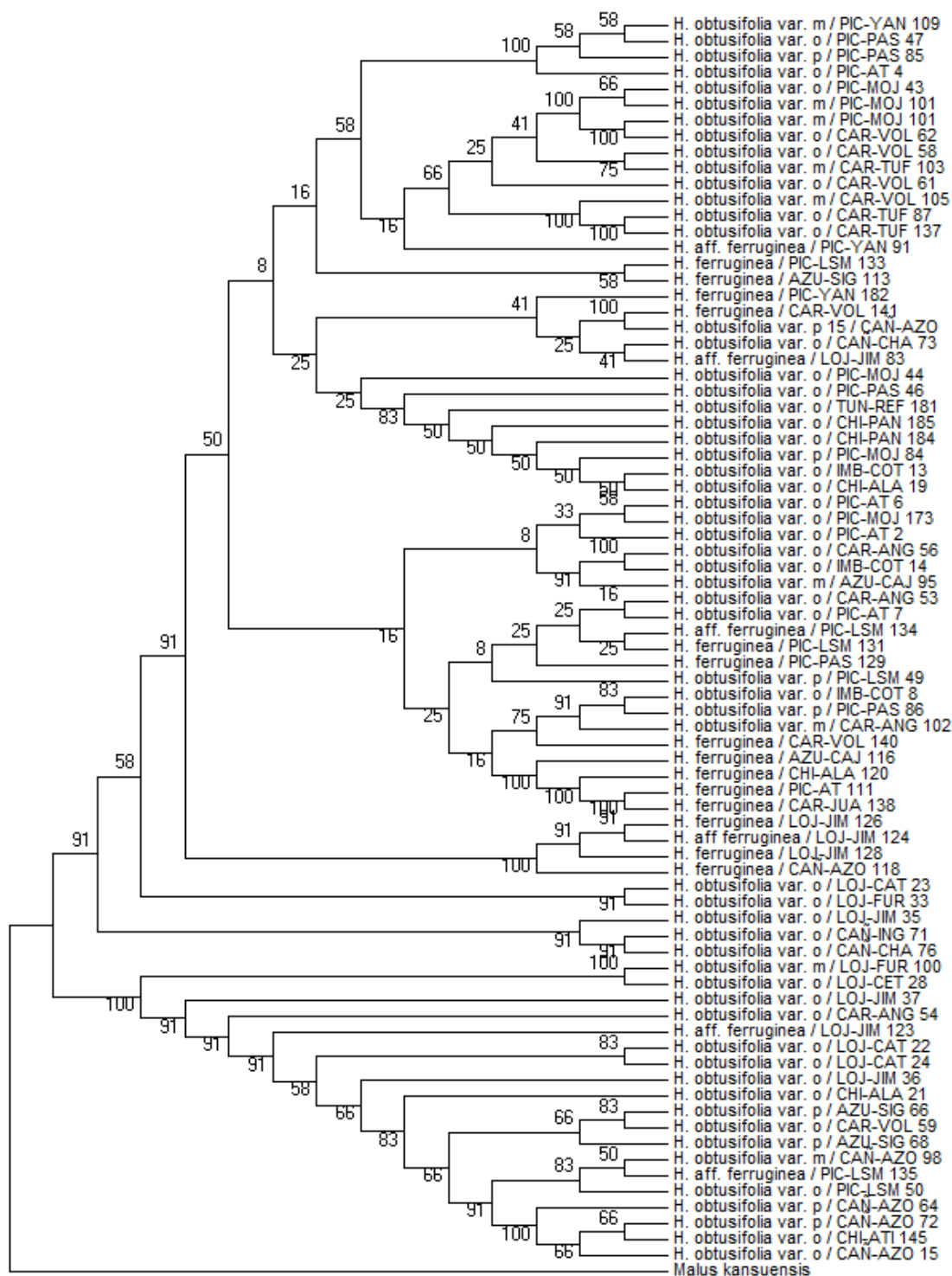
**Figura 5.** Diagrama de dispersión donde se observa la relación de los grupos de *Hesperomeles* con las funciones canónicas discriminantes.

Las secuencias utilizadas para el alineamiento fueron nombradas de acuerdo a la clasificación obtenida en los análisis morfométricos y la localidad en la cual fue colectada la muestra. El árbol de ITSs obtenido (Figura 6) en el análisis de máxima parsimonia no mostró resultados concluyentes, ya que no existen grupos diferenciados, incluso *H. ferruginea* que es morfológicamente distinto de *H. obtusifolia* no se diferencia en el árbol.

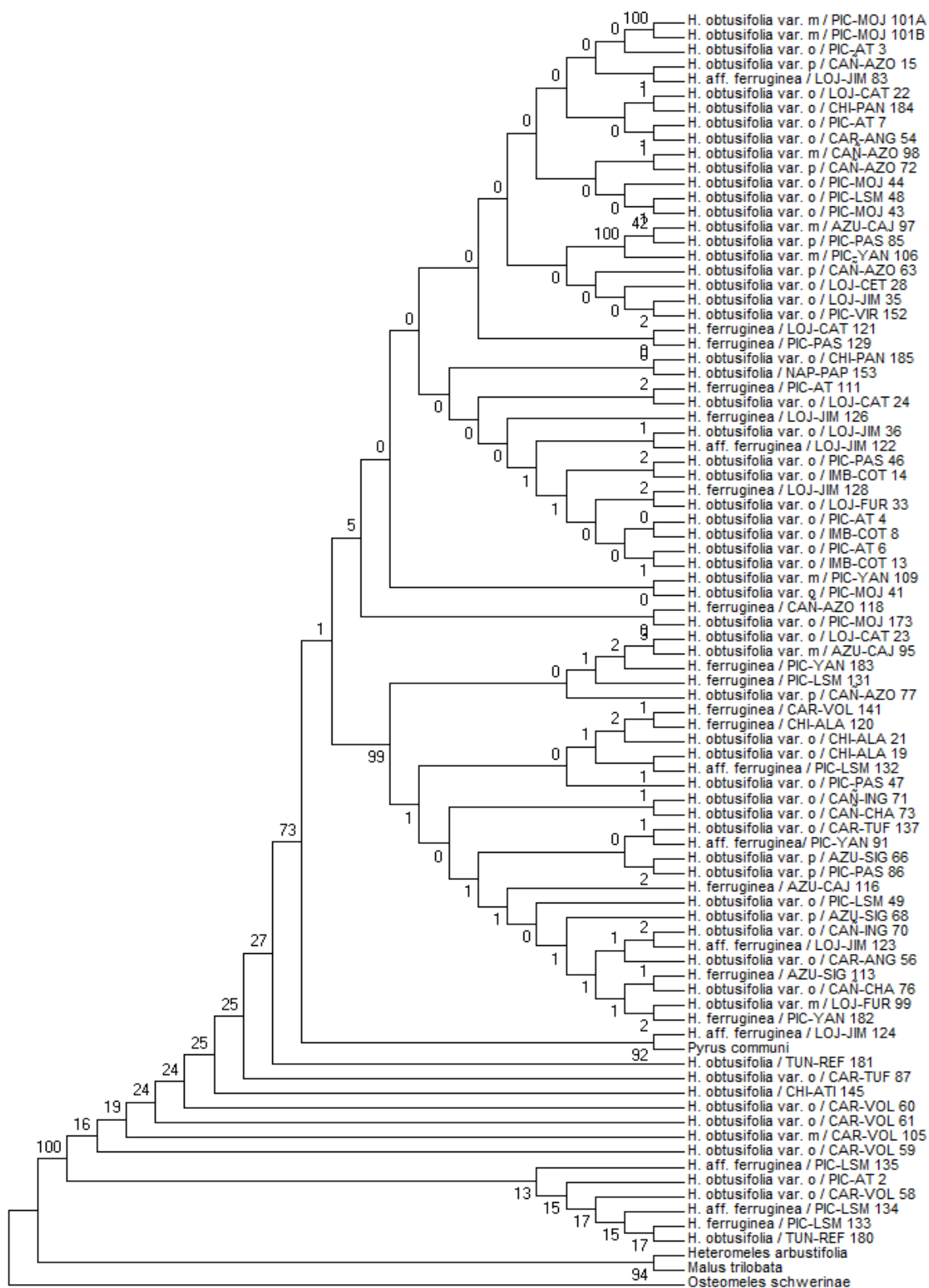
### **Espaciadores Intergénicos Cloroplásticos TRNL/TRNF**

Se obtuvo las secuencias de 87 individuos, incluyendo secuencias de *Pyrus communis* L., *Heteromeles arbutifolia* (Lindl.) M. Roem., *Malus trilobata* (Labill. ex Poir.) C. K. Schneider y *Osteomeles schwerinae* C.K. Schneid. que fueron utilizados como grupos externos, con lo cual se elaboró la matriz final de alineamiento, ésta incluyó 921 caracteres, de los cuales 882 (95%) fueron conservados, 19 (2%) variables y 7 (0.7%) fueron parsimonicamente informativos. La búsqueda de máxima parsimonia resultó en 500 árboles parsimónicos con una longitud de 172 pasos y un índice de consistencia (CI) de 0.72 y un índice de retención (RI) de 0.96.

De igual manera que en los ITSs, las secuencias utilizadas para el alineamiento fueron nombradas de acuerdo a la identificación obtenida en los análisis morfométricos y la localidad en la cual fue colectada la muestra, y al igual que el árbol de la región ITSs, los espaciadores intergénicos cloroplásticos no muestran resultados concluyentes, ya que no existen grupos diferenciados, además el soporte que presentan la mayoría de sus ramas es muy bajo (Figura 7).



**Figura 6.** Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de la región ITS. Se muestran los valores de bootstrap bajo las ramas.



**Figura 7.** Árbol consenso con regla de mayoría al 50% del análisis de máxima parsimonia de la región TRNL/TRNF. Se muestran los valores de bootstrap sobre las ramas.

## DISCUSIÓN

### Análisis morfométricos

Existe poca información morfométrica para diferenciar las especies del género *Hesperomeles* entre sí. Se ha propuesto que *Hesperomeles* tiene 20 especies reconocidas hasta el momento, la mayoría de las cuales se diferencian por la forma y el tamaño de las hojas (McVaugh, 1950). Sin embargo, es conocido que el tamaño y forma de las hojas y flores depende tanto de factores filogenéticos como fisiológicos y las necesidades biomecánicas moduladas por las condiciones del hábitat, como el régimen de luz, temperatura, humedad, disponibilidad de agua y nutrientes (Brown y Lawton, 1991; Givnish, 1986; Horn, 1971).

Además, las plantas pueden responder a cambios abióticos y bióticos generados por perturbaciones, expresados en atributos químicos, fisiológicos y morfológicos acorde a su plasticidad fenotípica, la cual ha sido reconocida como una estrategia importante en plantas que maximiza o mantiene su adecuación ante estos cambios (Delgado *et al.*, 2013). *Hesperomeles* no es la excepción y las diferencias entre las hojas de sus especies parecen estar relacionadas con el hábitat y con el vigor de la planta (McVaugh, 1950). Por esta razón fue importante establecer los límites, a través del análisis morfométrico, entre las especies y variedades existentes en el Ecuador, como se muestra en la tabla 2.

La revisión morfométrica realizada en este estudio, corrobora y proporcionan un soporte estadístico a los resultados obtenidos por Romoleroux, (1996), donde propone clasificar al género en dos especies: *H. ferruginea* y *H. obtusifolia*; y esta última especie en dos

variedades: *H. obtusifolia* var. *microphylla* y *H. obtusifolia* var. *obtusifolia* en base al tamaño y forma de las hojas.

Los análisis muestran que los caracteres importantes para diferenciar a las dos especies son: ausencia de espinas terminales, ramas y hojas cubiertas por una densa pubescencia ferruginosa y crecimiento en forma de árboles para *H. ferruginea* mientras que *H. obtusifolia* presenta espinas terminales, ramas y hojas glabras o con pubescencia escasamente dispersa y crecimiento en forma de arbustos.

En cuanto a las diferencias entre las variedades de *H. obtusifolia* resultan las hojas de mayor tamaño y el margen usualmente crenado o aserrado para la variedad *obtusifolia*, mientras que las hojas más reducidas y el margen siempre crenado o aserrado desde el medio de la lámina hacia el ápice para la variedad *microphylla* (tabla 2).

En las muestras colectadas se encontraron 9 individuos que presentan características intermedias entre *H. ferruginea* y *H. obtusifolia*; son arbustos sin espinas con hojas similares a las de *H. ferruginea* pero la pubescencia es dispersa blanca o ferruginosa. En este análisis morfométrico dichos individuos fueron clasificados como *H. ferruginea*, sin embargo, podrían tratarse de posibles híbridos entre las dos especies de *Hesperomeles*.

### **Relaciones evolutivas dentro de *Hesperomeles***

Dentro de la familia Rosaceae los límites entre géneros y entre especies han sido muy controversiales. Aun con información fósil de ciertos géneros (DeVore y Pigg, 2007; Wolfe y Wehr, 1988), la falta de una filogenia concreta ha obstaculizado el estudio de la edad de sus linajes y su historia biogeográfica. Las relaciones entre los linajes grandes de la familia aún no están resueltas completamente por varias razones, como: la falta de resolución

filogenética por hibridización, radiación rápida y una divergencia lenta a nivel molecular (Lo y Donoghue, 2012; Campbell *et al.*, 2007).

La delimitación de los géneros dentro de la subtribu Pyrinae ha sido discutida por más de un siglo (Lo y Donoghue, 2012). Pyrinae es ampliamente conocida por los botánicos por sus débiles barreras reproductivas, tanto entre especies estrechamente relacionadas, así como entre los miembros de diferentes géneros, estas características han causado desacuerdos para definir los géneros en un sentido estricto. Como consecuencia los fenotipos diferenciados tienen límites inciertos en varios niveles. La opinión más controversial sobre la clasificación de Pyrinae fue la propuesta por Sax (1931), quien propuso la fusión de todos los géneros pertenecientes a la subfamilia Maloideae en un solo género. Esta sugerencia no fue aceptada por la diversidad morfológica evidente dentro del grupo, y entre muchos de los géneros previamente reconocidos (Lo y Donoghue, 2012; Phipps *et al.*, 1991; Robertson *et al.*, 1991).

Eventos como la hibridización, poliploidía y apomixis en la subtribu han frustrado los intentos para inferir la historia evolutiva de Pyrinae, sin embargo en las últimas dos décadas se ha avanzado en la comprensión sobre la biología reproductiva, historia fósil, filogenia y morfología de este grupo (Lo y Donoghue, 2012; DeVore y Pigg, 2007; Dickinson *et al.*, 2007; Aldasoro *et al.*, 2004; Evans y Dickinson, 1999; Campbell *et al.*, 1995; Rohrer *et al.*, 1994; Robertson *et al.*, 1992, Robertson *et al.* 1991).

Al contrastar los resultados con lo expuesto anteriormente, se puede evidenciar la falta de resolución en las tendencias evolutivas de las dos variedades de *H. obtusifolia* y más al comparar las especies *H. ferruginea* con *H. obtusifolia*, cuya diferencia morfológica es

evidente. Incluso el árbol de TRNL/TRNF incluye al grupo externo *Pyrus comunis* dentro del grupo *Hesperomeles*. La falta de resolución en los análisis parece relacionada con la poca variabilidad en las secuencias analizadas. Los resultados indican que apenas el 13% de los caracteres analizados son variables en la región ITSs y solo el 8% proporcionan información parsimónica, mientras que en la región cloroplástica el 2% de los caracteres son variables y <1% son parsimonicamente informativos.

Una característica importante en la evolución de Pyrinae es el bajo nivel de divergencia entre géneros, (Evans y Campbell, 2002; Robertson *et al.*, 1991) lo cual es sorprendente en un grupo que proviene de mediados del Eoceno (Wolfe y Wehr, 1988). Esta limitada divergencia evolutiva puede ser resultado de las bajas tasas de evolución en plantas leñosas o en una continua circulación genética entre los géneros, o una combinación de los dos aspectos (Evans y Campbell, 2002). Por otro lado se conoce que Pyrinae evidencia una radiación reciente, los clados más antiguos fueron originados en el Eoceno aproximadamente hace 50 millones de años, mientras que el clado más relacionado con *Hesperomeles* (*Crataegus-Mespilus*) se originó en el Oligoceno hace 30 millones de años y la mayoría de especies se derivaron en el Mioceno hace tan solo 20 o 10 millones de años (Lo y Donoghue, 2012). La falta de resolución entre las ramas más profundas de Pyrinae puede estar relacionada a su rápida radiación (Campbell *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 1995) lo cual puede explicar la falta de resolución en mis resultados.

Los análisis morfométricos presentados en este estudio soportan la idea de que *H. ferruginea* difiere morfológicamente de *H. obtusifolia* por lo que deben seguir manteniendo su categoría de especies distintas, a pesar de que los resultados moleculares sugieren que no hay diferencia entre estas especies, dichos resultados pueden deberse a procesos de

hibridización los que crean fenotipos intermedios y genotipos muy parecidos y facilitan la introgresión de los plástidos maternos de una especie a otra (Pamilo y Nei, 1988). Al igual que para las especies se sugiere que las variedades de *H. obtusifolia* deben seguir manteniendo su categoría, ya que la poca variación existente en las secuencias de ADN ribosomal y cloroplástico contrastada con la variación morfológica evidencia una diferenciación a nivel infraespecífico. Para estudios posteriores se sugiere utilizar un mayor número de marcadores moleculares que tengan mayor resolución.

### **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a la Doctora Katya Romoleroux por su dirección y apoyo en esta investigación, al herbario QCA por sus instalaciones, al Licenciado Javier Irazábal por su apoyo y esfuerzo en la realización de este estudio, al Licenciado Diego Morales por su guía para los análisis moleculares y a la Licenciada Cristina Toapanta por su apoyo en el procesamiento de las secuencias.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldasoro JJ, Aedo C, Garmendia FM, de la Hoz FP y Navarro C. 2004. Revision of *Sorbus* subgenera *Aria* and *Torminaria* (Rosaceae-Maloideae). *Systematic Botany Monographs*, 1-148.
- Broughton E, Stanley S y Durrett R. 2000. Quantification of homoplasy for nucleotide transitions and transversions and a reexamination of assumptions in weighted phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **49**(4): 617-627.
- Brown BK y Lawton JH. 1991. Herbivory and the evolution of leaf size and shape. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 333: 265-272.
- Campbell CS, Baldwin BG, Donoghue MJ y Wojciechowski MF. 1995. A phylogeny of the genera of Maloideae (Rosaceae): Evidence from Internal Transcribed Spacers of nuclear ribosomal DNA sequences and congruence with morphology. *American Journal of Botany*, **82**, 903-918.
- Campbell CS, Evans RC, Morgan DR, Dickinson TA y Arsenault MP. 2007. Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant systematics and evolution*, **266**(1-2): 119-145.
- Cerón C, Palacios W, Sierra R y Valencia R. 1999. Las formaciones naturales de la sierra del Ecuador. En: Sierra R. (Ed.). 1999. Propuesta Preliminar de un Sistema de Clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. *Proyecto INEFAN/GEF-BIRF y EcoCiencia*. Quito, Ecuador.

- Cullings KW. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1:233-240.
- De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M y Balslev H. 2008. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador. *Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus*. Quito y Aarhus.
- Delgado AC, Jain SE, Sánchez MS y Reyes PC. 2013. Cambios en la morfología floral y foliar en *Crataegus tracyi*: importancia de la asimetría fluctuante como indicador de estrés ambiental. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo*, **13**(1), 44-49.
- DeVore ML y Pigg KB. 2007. A brief review of the fossil history of the family Rosaceae with a focus on the Eocene Okanogan Highlands of eastern Washington State, USA, and British Columbia, Canada. *Plant Systematics and Evolution*, **266**(1-2), 45-57.
- Dickinson TA, Lo E y Talent N. 2007. Polyploidy, reproductive biology, and Rosaceae: understanding evolution and making classifications. *Plant systematics and evolution*, **266**(1-2), 59-78.
- Doyle J y Dickson E. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon*, 36:715-722.
- Doyle J y Doyle J. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin*, 19:11-15.

- Evans RC y Campbell CS. 2002. The origin of the apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA sequence data from duplicated GBSSI genes. *American journal of botany*, **89**(9), 1478-1484.
- Evans RC y Dickinson TA. 1999. Floral ontogeny and morphology in subfamily Spiraeoideae Endl.(Rosaceae). *International journal of plant sciences*, **160**(5), 981-1012.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791.
- Givnish TJ. 1986. Economics of biotic interactions. En: TJ Givnish (ed), The economy of plant form and function. pp 667–680. Cambridge, *Cambridge University Press*.
- Horn HS. 1971. The adaptative geometry of trees. Princeton, *Princeton University Press*.
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI y Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic acids research*, **30**(14): 3059-3066.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P y Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, **28**(12): 1647-1649.
- Li QY, Guo W, Liao WB, Macklin JA y Li JH. 2012. Generic Limits of Pyrinae: Insights from Nuclear Ribosomal DNA Sequences. *Botanical Studies*, **53**(1): 151-164.

- Lo EY y Donoghue MJ. 2012. Expanded phylogenetic and dating analyses of the apples and their relatives (Pyreae, Rosaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, **63**(2): 230-243.
- McVaugh R. 1950. Rosaceae [exc. Hesperomeles] En: Flora of Panama. Ann. Missouri Botanical Garden. 37: 138-140.
- Pamilo P y Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular biology and evolution*, **5**(5): 568-583.
- Phipps J. 1983. Biogeographic, taxonomic, and cladistic relationships between East Asiatic and North American Crataegus. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 70: 667–700.
- Phipps JB, Robertson KR., Rohrer JR y Smith PG. 1991. Origins and evolution of subfam. Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, 303-332.
- Potter D, Eriksson T, Evans R, Oh S, Smedmark J, Morgan D, Kerr M, Robertson K, Arsenault M, Dickinson T y Campbell C. 2007. Phylogeny and classification of Rosaceae. *Plant Systematics and Evolution*. 266: 5–43.
- Robertson KR, Phipps JB y Rohrer JR. 1992. Summary of leaves in the genera of Maloideae (Rosaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 81-94.
- Robertson KR, Phipps JB, Rohrer JR y Smith PG. 1991. A synopsis of genera in Maloideae (Rosaceae). *Systematic Botany*, 376-394.
- Rohrer JR, Robertson KR y Phipps JB. 1994. Floral morphology of Maloideae (Rosaceae) and its systematic relevance. *American journal of botany*, 574-581.

- Romoleroux K. 1989. Estudio Taxonómico de los géneros *Polylepis*, *Hesperomeles* (Rosaceae), *Escallonia* (Grossulariaceae) y *Columellia* (Columelliaceae) en el Bosque Montano Ecuatoriano. *Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Quito, Ecuador.
- Romoleroux K. 1996. Rosaceae. En: Flora of Ecuador. (Harling, G. y Anderson, L. eds.) No. 56. *University of Gotenborg; Riksmuseum; Pontificia Universidad Católica del Ecuador*, Goterborg; Stockholm; Quito.
- Sax K. 1931. The origin and relationships of the Pomoideae. *Journal of the Arnold Arboretum*. 12, 3-22.
- Sklenár P, Luteyn J, Ulloa C, Jorgensen P y Dillon M. 2005. Flora Genérica de los Páramos. Guía ilustrada de las plantas Vasculares. *The New York Botanical Garden press*. USA.
- SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago: *SPSS Inc*.
- Sterling C. 1964. Comparative morphology of the carpel in the Rosaceae. III Pomoideae: *Crataegus*, *Hesperomeles*, *Mespilus*, *Osteomeles*. *American Journal of Botany*. **51**(7): 705-712.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A y Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Troya V, Cuesta F y Peralvo M. 2004. Food habits of Andean bears in the Oyacachi River Basin, Ecuador. *Ursus* **15**(1):57-60.

Wolfe JA y Wehr W. 1988. Rosaceous Chamaebatiaria-like foliage from the Paleogene of western North America. *Aliso*. USA.