

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE TABLAS	v
LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE ANEXOS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Formulación del problema	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos de la investigación	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. Marco Teórico.....	4
1.4.1. El género <i>Polylepis</i>	4
1.4.1.1. Características morfológicas.....	5
1.4.1.2. Taxonomía	7
1.4.1.3. Distribución geográfica	11
1.4.1.4. Función ecológica.....	12
1.4.1.5. Destrucción de los bosques	14
1.4.2. Dinámica de poblaciones.....	16
1.4.2.1. Estructura genética	16
1.4.2.2. Evolución y equilibrio de Hardy-Weinberg	22
1.4.3. Técnicas moleculares.....	24
1.4.3.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	24
1.4.3.2. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	26
1.4.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa	27
1.4.3.4. Marcadores moleculares	28
1.4.3.5. Poder de resolución de un primer	31
1.4.4. Análisis de datos de marcadores dominantes	32
1.4.4.1. Coeficientes de similaridad	33
1.4.4.2. Agrupamientos y dendogramas	34

1.4.5. Diferenciación de poblaciones.....	34
1.4.5.1. F de Wright.....	35
1.4.5.2. AMOVA.....	35
1.4.5.3. Test de Mantel.....	36
1.5. Sistema de hipótesis.....	37
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
2.1. Participantes.....	38
2.2. Zona de Estudio.....	38
2.3. Período de tiempo de investigación.....	38
2.4. Diseño.....	39
2.5. Procedimientos.....	39
2.5.1. Recolección de muestras.....	39
2.5.2. Extracción de ADN.....	42
2.5.2.1. Protocolo de extracción de ADN de Edwards (1991).....	42
2.5.2.2. Protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1987).....	42
2.5.2.3. Protocolo de extracción de ADN de Khanuja <i>et al.</i> (1999)..	43
2.5.2.4. Protocolo de extracción de ADN de Porebski <i>et al.</i> (1997) .	44
2.5.3. Preparación de geles de agarosa.....	45
2.5.4. Cuantificación de DNA.....	45
2.5.5. Amplificación de secuencias mediante ISSRs.....	46
2.5.6. Visualización de productos amplificados.....	49
2.5.7. Registro de datos.....	49
2.6. Análisis de datos.....	50
2.6.1. Genética poblacional.....	50
2.6.1.1. Cálculo de distancias genéticas.....	50
2.6.1.2. Análisis de la diferenciación genética.....	51
2.6.1.3. Análisis de agrupamiento.....	52
2.6.1.4. Relaciones biogeográficas.....	52
2.6.2. Análisis de primers.....	53
CAPÍTULO 3: RESULTADOS.....	54
3.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	54

3.2. Exstandarización de las condiciones de temperatura y MgCl ₂ para la amplificación de los ISSRs	56
3.2.1. Estandarización de la temperatura alineamiento	56
3.2.2. Estandarización del MgCl ₂	58
3.3. Amplificación de marcadores tipo ISSRs	60
3.4. Análisis de datos	63
3.4.1. Genética poblacional	63
3.4.1.1. Distancias genéticas y agrupamientos	63
3.4.1.2. Diferenciación genética	70
3.4.1.3. Relaciones biogeográficas	71
3.4.2. Análisis de primers	72
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	77
4.1. Estandarización de la extracción de ADN	77
4.2. Estandarización de las condiciones para la amplificación de ISSRs	78
4.3. Amplificación de los marcadores ISSRs	79
4.4. Distancias genéticas	80
4.5. Agrupamientos y biogeografía	83
4.6. Diferenciación genética	84
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	86
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	88
CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	90
ANEXOS	105

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Variables analizadas en el estudio de genética poblacional de <i>P. pauta</i> y <i>P. incana</i>	39
Tabla 2.2 Muestras recolectadas para el estudio con sus detalles de codificación, especie, parche correspondiente, puntos de localización global y altura. ...	40
Tabla 2.3 Lista de los diez primers usados en el estudio con sus respectivas secuencias	46
Tabla 2.4 Condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación de secuencias ISSRs.	47
Tabla 2.5 Temperatura de melting calculada y temperaturas de alineamiento ensayadas para cada uno de los 10 primers.....	48
Tabla 2.6 Concentraciones de los reactivos para la amplificación de ISSRs. Se estandarizaron las concentraciones específicas para cada primer.	49
Tabla 3.1 Temperaturas de alineamiento (T_a) empleadas en los ensayos de estandarización y temperatura de alineamiento optimizada para los 10 primers del estudio.	57
Tabla 3.2 Concentraciones de $MgCl_2$ específicas por primer.....	59
Tabla 3.3 Medidas de diversidad genética en función de similitudes y disimilitudes, dentro de cada parche, de cada población y entre poblaciones.	64
Tabla 3.4 Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). La fuente de variación en este análisis son las poblaciones de <i>P. pauta</i> de Papallacta, <i>P. incana</i> de Papallacta y <i>P. incana</i> de los Ilinizas.	70
Tabla 3.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). La fuente de variación son las poblaciones del estudio que se encuentran en dos grupos en el primero <i>Polylepis incana</i> de Papallacta y los Ilinizas y en el segundo <i>P. pauta</i> de Papallacta. Se muestran los porcentajes de variación y valores de significancia estadística.	71
Tabla 3.6 Test de Mantel calculado a partir de las matrices de similitud y disimilitud genética versus la matriz de distancias geográficas. Se muestran los valores de correlación y de significancia estadística entre las matrices.....	71
Tabla 3.7 Número de bandas polimórficas y monomórficas por primer.....	72
Tabla 3.8 Valores de resolución de primer los 10 primers del estudio.....	73

LISTADO DE FIGURAS

- Figura 1.1** Fotografía de un árbol de *Polylepis incana* en el páramo de Papallacta. Punto de colecta P1 a 3518 msnm, 00°03.795`S y 078°15.036`O (Ochoa, 2008). 4
- Figura 1.2** Características morfológicas de *P. pauta*. a) rama, b) envés de hoja, c) parte superior del punto de unión de foliolo, d) parte inferior del punto de unión de foliolo, e) flor, f) fruto (Simpson, 1979). 8
- Figura 1.3** Distribución geográfica potencial de *P. pauta* en el Ecuador (Segovia, 2006). 9
- Figura 1.4** Características morfológicas de *P. incana*. a) rama, b) envés de hoja, c) parte superior del punto de unión de foliolo, d) fruto, e) flor (Simpson, 1979). . 10
- Figura 1.5** Distribución geográfica potencial de *P. pauta* en el Ecuador (Segovia, 2006). 11
- Figura 1.6** Fotografía de un bosque de *Polylepis* en la parte superior de la laguna de Mojanda, la cual se localiza a 3787 msnm, 078°15.570`O y 00°07.246`S (Ochoa, 2006). 13
- Figura 1.7** Se presenta un único linaje (especie) que se divide para formar dos linajes. La degradación del color gris representa a los linajes hijos que divergen y las líneas horizontales (criterio de especies) representan los períodos en el cual adquieren diferentes propiedades. Todas las propiedades forman una zona gris dentro de la cual conceptos alternativos de especie llegan a conflicto. Antes de la adquisición de la primera propiedad, todos estarán de acuerdo que es una sola especie, y después de la adquisición de la última propiedad todos estarán de acuerdo que hay dos (Queiroz, 2007). 23
- Figura 1.8** Esquema de las secuencias ISSRs, sus primers y productos amplificados (IPGRI y Cornell University, 2003). 30
- Figura 2.1** Mapa del Ecuador donde se encuentran señalados los páramos de Papallacta y los Ilinizas, localizaciones en las cuales se recolectaron las muestras para este estudio..... 41
- Figura 3.1** Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Doyle & Doyle (1987). En el gel se encuentra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*. 54
- Figura 3.2** Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Edwards (1991). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb

DNA Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*..... 55

Figura 3.3 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Porebski *et al.* (1997). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN®, un marcador High Mass Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*. 55

Figura 3.4 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN con el protocolo de Porebski *et al.*, (1997). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN®, un marcador High Mass Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. incana* y los otros cinco a *P. pauta*. 56

Figura 3.5 Electroforesis en gel al 1,5% del ensayo de pruebas de temperatura para el primer 17898B. Se utilizó un solo individuo, con dos repeticiones para cada temperatura y un marcador molecular de 100 pb DNA Ladder INVITROGEN®..... 58

Figura 3.6 Electroforesis en gel al 1,5% de pruebas de concentración de MgCl₂ con el primer HB9. Se usaron dos accesiones con dos repeticiones de cada una con cada concentración y en el gel se colocó un marcador de 100pb DNA Ladder INVITROGEN®. 59

Figura 3.7 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB11 en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos..... 60

Figura 3.8 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB9 en la población de *P. incana* de Papallacta. En la accesión 2P1 se observa un menor número de amplicones y una baja intensidad de las bandas amplificadas en comparación con resto de accesiones. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos..... 61

Figura 3.9 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB14 en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Las accesiones 11I, 12I y 13I presentan un menor número de amplicones y una baja intensidad en las bandas amplificadas en comparación con resto de accesiones. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos..... 62

Figura 3.10 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer 17899A en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Entre los 300 y 1200pb hay varias bandas que presentan una baja intensidad y poca distancia entre ellas. . Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos..... 63

- Figura 3.11** Matriz triangular de contingencia en base al coeficiente de similaridad Dice, donde se comparan todos los individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones (*P. pauta* de Papallacta, *P. incana* de Papallacta y *P. incana* de los Ilinizas). El color verde representa los valores bajos de similitud, el color beige los valores medios y el anaranjado los valores altos..... **65**
- Figura 3.12** Matriz triangular de contingencia en base al índice de concordancia Kappa, donde se comparan todos los individuos dentro de las poblaciones y entre las poblaciones (*P. pauta* de Papallacta, *P. incana* de Papallacta y *P. incana* de los Ilinizas). El color verde representa los bajos de similitud, el color beige los valores medios y el anaranjado los valores altos..... **65**
- Figura 3.13.** Dendograma generado mediante un agrupamiento UPGMA en base a similitudes calculadas mediante el coeficiente de Dice. Los niveles en los que se localizan los nodos indican los valores del promedio de similitud a partir de los cuales se separan los grupos. Los individuos con la codificación P1 y P2 corresponde a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 corresponden a *P. pauta* de papallacta y I corresponde *P. incana* de los Ilinizas..... **66**
- Figura 3.14** Dendograma generado mediante el método del vecino más cercano en base a similitudes calculadas mediante el coeficiente de Dice. La cercanía de dos individuos y que estos se desprendan de una misma rama indica el grado de similitud entre ellos. Los individuos con la codificación P1 y P2 corresponde a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 corresponden a *P. pauta* de papallacta y I corresponde *P. incana* de los Ilinizas..... **68**
- Figura 3.15** Análisis de componentes principales de los treinta individuos objeto del estudio, en base a la presencia y ausencia de bandas. **69**
- Figura 3.16** Análisis factorial de correspondencias múltiples entre los diez primers y los páramos de Papallacta y los Ilinizas. La cercanía de los primers al páramo indica la presencia de una mayor cantidad de bandas en esa localidad..... **74**
- Figura 3.17** Análisis factorial de correspondencias múltiples entre los diez primers y las especies *P. incana* y *P. pauta*. La cercanía de los primers a la especie indica la presencia de una mayor cantidad de bandas en esa localidad..... **75**
- Figura 3.18** ACP con el primer generado mediante el primer 17899A. Los códigos P1 y P2 pertenecen a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 a *P. pauta* e I a *P. incana* de los Ilinizas..... **75**
- Figura 3.19** ACP con el primer 844B. Los códigos P1 y P2 pertenecen a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 a *P. pauta* e I a *P. incana* de los Ilinizas. **76**

LISTADO DE ANEXOS

- Anexo A.** Protocolo de extracción de ADN modificado, Khanuja *et al.*, 1999 ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo B.** Patrón de bandas con el primer HB12 en la población de *P. pauta* de Papallacta ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo C.** Patrón de bandas del primer HB12 en la población de *P. incana* de los Ilinizas. ¡Error! Marcador no definido.
- Anexo D.** Sección de la matriz binaria..... ¡Error! Marcador no definido.

RESUMEN

Actualmente los bosques de *Polylepis* están disminuyendo debido a diversas actividades antropogénicas. En los últimos años se han hecho ciertos esfuerzos para conservarlos y regenerarlos, sin embargo, las reforestaciones no han sido realizadas de una manera técnica ya que no se ha tomado en cuenta el estado del acervo genético de las poblaciones. El conocimiento de la estructura genética de las poblaciones con las interrelaciones de las características del lugar, parámetros históricos y diferenciación genética proveen invaluable información para la formulación de políticas de protección y administración, efectivas para especies en peligro. Por ello, en este estudio se buscó conocer la estructura genética poblacional de *Polylepis incana* y *P. pauta* en los páramos de Papallacta y Los Ilinizas mediante ISSRs. Para lo cual, se recolectaron muestras de tres poblaciones en los páramos de Papallacta y los Ilinizas, se aisló ADN y se amplificó secuencias ISSR con un set de 10 primers. Del análisis de los datos registrados se observó que la menor diversidad genética la presentó *P. incana* y la población con mayor diversidad genética fue la de *P. pauta* de Papallacta. Todos los individuos se agruparon en la población a la que pertenecían y la tendencia de agrupamiento se dio en función de la especie más no de la localidad muestreada, debido a que no se presentó correlación entre la similaridad genética y la localización geográfica. La varianza molecular dentro de las poblaciones es muy baja, mientras que entre poblaciones es alta, lo cual indica un proceso de fragmentación y deriva génica, debido a los indicios de divergencia genética entre las poblaciones y la disminución de la disimilaridad de los individuos, además sugiere que en las poblaciones analizadas no se está generando una respuesta adaptativa al medio.

ABSTRACT

Polylepis forests are endangered due mainly to the impact of human population and forest misuse. In the last few years some efforts have been made aiming at *Polylepis* forest conservation. However, reforestation plans have not in many cases included adequate technical features. Usually these strategies have not consider the genetic status *Polylepis* populations. Population genetics along with geographical relationships, historical parameters and genetic differentiation provide reliable information for policy-making procedures focusing on protecting endanger species. In the present study we analyzed the genetic structure of populations of *P. incana* and *P. pauta* in Papallacta and Los Ilinizas with ISSRs by the use of molecular markers (ISSRs). Samples collected underwent, DNA extraction and ISSRs were amplified with a set of already published primers. We observed that *P. incana* has less genetic diversity than *P. pauta*. Each accessions cluster into the population it belongs to. The tendency of the clustering was specie-related rather than location-related. We did not find a correlation between genetic similarities and sites of sample collection. Analyses of molecular variability show that genetic diversity was low within populations, but high among populations. These findings suggested a process of habitat fragmentation that will require further studies.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

Los bosques andinos de árboles del género *Polylepis* están disminuyendo notablemente en nuestro país, llegando al punto en que actualmente no se encuentran parches identificados previamente. Las principales causas para la pérdida de los bosques de *Polylepis* en el Ecuador son las actividades antropogénicas. Para la población de campesinos que habitan en las zonas andinas la preocupación por la conservación de la diversidad biológica es secundaria a su lucha diaria por sobrevivir (Kessler, 2002). La madera de *Polylepis* es muy apreciada porque resiste a la humedad y da lugar a carbón de buena calidad. Los bosques andinos son sometidos constantemente a incendios para regenerar los pastos útiles para el ganado y las ovejas. Algunos árboles maduros sobreviven a los incendios al estar protegidos por su corteza mientras que las plántulas mueren fácilmente lo cual limita la regeneración del bosque (Fjedsa y Kessler, 2004).

En los últimos años se han iniciado procesos con la finalidad de conservar y reforestar los bosques de *Polylepis*, sin embargo, estas reforestaciones no tienen un soporte técnico adecuado (Enrico, Funes & Gabido, 2004). En Ecuador se ha puesto en marcha una extensa reforestación con *Polylepis racemosa* (material traído del Perú), la cual está alterando el acervo genético de las especies de nuestro país, debido a que *Polylepis racemosa* es una especie muy invasiva que hibridiza fácilmente con otras especies (Kessler, 1995). Como consecuencia, al no tomar en cuenta la estructura genética y otras características como el tiempo de crecimiento de nuestras poblaciones, para la realización de procesos de reforestaciones técnicos, se está corriendo el riesgo de causar un daño irreparable a los bosques de *Polylepis* en nuestro país.

1.2 Justificación del problema

Los bosques formados por árboles del género *Polylepis* son la vegetación natural de los Andes que va entre los 3500 a 5000 msnm (Kessler, 1995). Estos bosques se desarrollan a la mayor altitud registrada entre los árboles leñosos del geotrópico y actualmente se encuentran formando parches entre los pajonales. Los parches constituyen verdaderos oasis biológicos en los páramos, debido a que los bosques reducen las fluctuaciones de temperatura, lo cual favorece el desarrollo de mamíferos, aves, insectos, plantas medicinales, alimenticias, entre otros (Kessler & Herzog, 1998).

Los bosques de *Polylepis* favorecen también a las precipitaciones, aumentando la humedad del aire gracias a mecanismos de condensación y transpiración en las hojas. Estos bosques, al retener agua, producto de las precipitaciones, tienen la capacidad de liberarla gradualmente incluso durante la estación seca. Cuando se libera el efluente la vegetación y la parte orgánica del suelo retienen las impurezas (Bucher & Schofield, 1981), dando lugar a un agua de mayor calidad. Otra función de los bosques de montaña es proteger al suelo contra la erosión. No solo *Polylepis* sino una gran cantidad de plantas de pequeño tamaño que se desarrollan dentro de los parches de le dan soporte y agarre al suelo. De esta manera, se acumula la capa orgánica en los terrenos y se evita la ocurrencia de taludes que pueden dañar viviendas y caminos.

Sin embargo, en la actualidad los bosques de *Polylepis* se están perdiendo debido a diversas actividades antropogénicas, esto sucede debido a que no se comprende el valor indirecto de estos bosques. En las zonas andinas se utiliza la madera de *Polylepis* para la elaboración de carbón y para postes en cercas. En los páramos se provocan constantemente incendios para regenerar los pastizales y como parte de ciertos rituales indígenas (Kessler y Driesch, 1994). Todos estos factores incrementan la fragmentación natural de los bosques de *Polylepis* (Laegaard, 1992).

La fragmentación de los hábitats puede impactar negativamente a las poblaciones del bosque conduciendo a una reducción de la variación genética y un incremento de las

distancias genéticas entre las poblaciones, provocando el aislamiento geográfico y genético (Culley, Sbita & Wick, 2007). Este y otros procesos que dan lugar a los diferentes patrones biogeográficos de distribución de *Polylepis* (Qamaruz, Fay, Parker & Chase, 1998), pueden ser evidentes con patrones genéticos que proveen ciertas evidencias de la historia evolutiva de las especies y los procesos involucrados (Scheen, Elven & Brochman, 2002). Es importante el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones con las interrelaciones geográficas, parámetros históricos y diversidad genética, al proveer invaluable información para la creación de políticas de protección y administración efectivas para especies en peligro (McCauley & Ballard, 2002).

Esta investigación es útil para dar a conocer, a la comunidad científica nacional e internacional vinculada en la conservación, el estado de la variabilidad genética de los bosques de *Polylepis* en el Ecuador. Para así poder realizar programas de reforestación y conservación técnicos que se requieren en los páramos. La información generada por este estudio servirá como base para la realización de futuros análisis genéticos en *Polylepis* u otras especies forestales, implementando así nuevas técnicas y protocolos en los laboratorios de Biotecnología de la ESPE.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Conocer la estructura genética poblacional de *Polylepis incana* y *Polylepis pauta* en los páramos de Papallacta y los Ilinizas mediante ISSRs

1.3.2 Objetivos específicos

- Implementar y estandarizar un protocolo para extracción de ADN en *Polylepis*.
- Estandarizar y optimizar la técnica de PCR para cada uno de los 10 primers de ISSRs a usarse.
- Analizar los resultados obtenidos mediante un software aplicable en análisis genéticos.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 El género *Polylepis*

El nombre *Polylepis* se deriva de las palabras griegas *poly* (muchas) y *lepis* (capas). Este género se localiza a partir de los 3500 msnm hasta los 5200 msnm, en estas elevaciones las especies forestales son escasas en número y variedad, por lo tanto, *Polylepis* es uno de los pocos árboles leñosos (Figura 1.1) que puede desarrollarse a tales altitudes. Este género consta de 26 especies (Kessler & Schmidt, 2006) distribuidas únicamente en los Andes, existen parches de *Polylepis* en 6 países que son: Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Chile y Argentina (Simpson, 1979). En Ecuador existen 7 especies que son: *P. incana*, *P. lanuginosa*, *P. microphylla*, *P. pauta*, *P. reticulata*, *P. sericea* y *P. weberbaueri*, de las cuales, *P. lanuginosa*, *P. microphylla* y *P. weberbaueri* son endémicas.

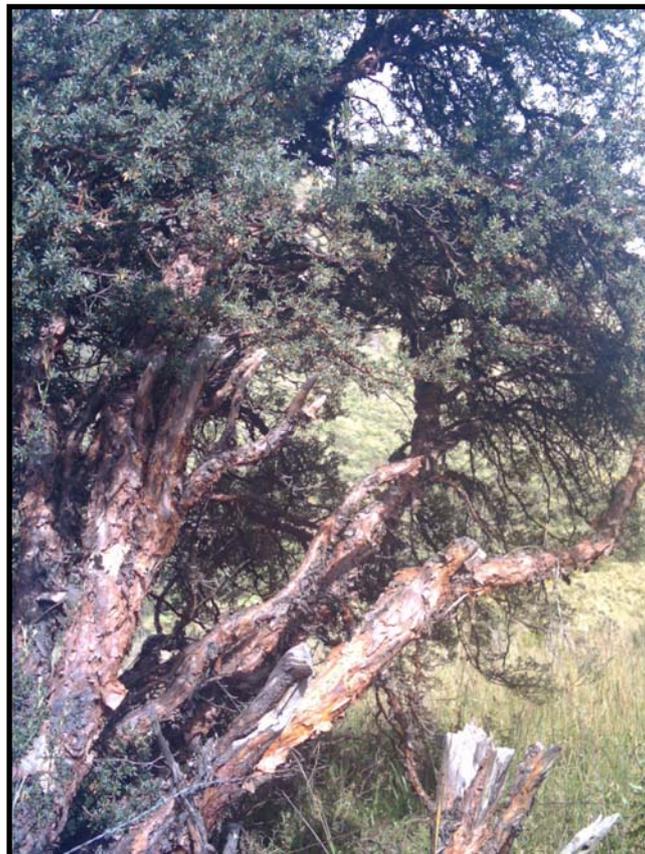


Figura 1.1 Fotografía de un árbol de *Polylepis incana* en el páramo de Papallacta. Punto de colecta P1 a 3518 msnm, 00°03.795'S y 078°15.036'O (Ochoa, 2008).

1.4.1.1 Características morfológicas

Todas las especies de *Polylepis* son árboles o arbustos cuya altura oscila entre 1 a 27 m. Todos los taxones tropicales que crecen en elevaciones relativamente bajas son árboles altos y por lo tanto, las especies que crecen a partir de los 3800 msnm aproximadamente son generalmente árboles y arbustos pequeños (Simpson 1979; Tosi, 1960).

La corteza de *Polylepis* consiste en numerosas capas finas de hojas de corteza que se exfolian, todas estas capas pueden tener alrededor de una pulgada de grosor. Aparentemente, esta corteza sirve como aislamiento de las heladas nocturnas y la intensa radiación diurna. Debido al medio en que se desarrollan los árboles tienden a ser torcidos y contorneados, lo que normalmente se lo asocia al viento, frío y los hábitats áridos. Dentro de los patrones de ramificación su crecimiento es simpodial (Hedberg, 1964).

Todas las especies de *Polylepis* tienen hojas compuestas, imparipinnadas (uno a nueve pares) y alternadas. Las hojas se aglomeran en los extremos de las ramas y nacen de manera alternada. Cada hoja tiene un par de estípulas fusionadas alrededor de la rama formando una envoltura. La aglomeración de las hojas resulta en un patrón de amontonamiento y conos invertidos debido al solapamiento de las estípulas. Las hojas jóvenes y las estípulas tienden a ser más pubescentes que las hojas maduras, debido a que las inflorescencias nacen en las axilas de las hojas y las hojas jóvenes son particularmente más sensibles al frío, esta densa pubescencia puede servir para aislar los tejidos sensitivos (Simpson, 1979).

Dentro de este género existen dos tipos de tricomas: *capilli resiniferi* y *capilli pili*. El primero incluye a la mayoría de tricomas multicelulares y aparentemente contienen o secretan resina, la cual produce un material rojo o anaranjado. Los tricomas *capilli pili* son unicelulares o con dos células basales cuya forma varía de cortos a largos (lanosos,

ásperos o suaves), formando un anillo junto con las estípulas alrededor de las ramas (Hedberg, 1964). La cobertura en el envés y a veces en el haz de los folíolos es muy específica de las especies, aunque la densidad de los tricomas puede frecuentemente variar dentro de una especie. Los miembros del grupo *sericea* usualmente tienen tricomas largos en el envés de los folíolos pero el patrón de localización de los tricomas varía de una especie a otra. En el grupo *reticulata* todo el taxón tiene tricomas en el envés de los folíolos, pero difiere del grupo *sericea* por la presencia de un segundo tipo de tricomas. Las especies de todo el complejo *incana* tienen tricomas pequeños y glandulares, los cuales secretan una resina amarillenta que se dispersa en todas sus superficies (Simpson, 1979).

Las flores de todas las especies del género nacen de inflorescencias, en la mayoría de los casos la inflorescencia es lo suficientemente larga para permanecer colgada. En especies con inflorescencias colgantes, las flores nacen regularmente a lo largo del raquis. Algunos racimos de flores presentan una reducción de la inflorescencia, que resulta de la selección a las condiciones extremas en estas elevaciones. Las flores, en sí mismas, están reducidas y esto se relaciona estrechamente con la polinización llevada a cabo por el viento. La reducción a dado lugar, a la ausencia de pétalos, sépalos verdes en lugar de sépalos coloreados, ausencia de perfume y néctar, numerosas anteras con largos filamentos, polen abundante y seco, un estigma largo y fibrilado con hojas compuestas. La reducción de las inflorescencias en algunas poblaciones puede deberse a su adaptación por la polinización del viento ya que, se ha visto que las especies con inflorescencias reducidas normalmente crecen en áreas muy ventosas. La reducción puede representar un compromiso entre: la sobreexposición a células de polen materno vulnerables y las adaptaciones a la polinización anemófila (Simpson, 1979; Whitehead, 1969).

Los caracteres taxonómicos más importantes para distinguir entre especies de *Polylepis* están dados por las hojas y sus folíolos. Entre estos caracteres tenemos el número de pares de folíolos, la forma de los bordes, el tamaño, el tipo de ápice, el aspecto de la base y la cobertura. Sin embargo, los caracteres de los folíolos son frecuentemente correlacionados con otros, como el largo de la inflorescencia y tipo de

protuberancias en los frutos. Además, varios taxones difieren de uno a otro en el tipo y cantidad de tricomas que cubren los raquis. Los raquis pueden ser tomentosos, vellosos, lanosos, sericeos, pilosos o granulares (Romoleroux, 1996; Simpson, 1979)

1.4.1.2 Taxonomía

El género *Polylepis* se encuentra en la familia de las Rosaceas subfamilia Rosoidae, tribu Sanguisorbae. Al género *Polylepis* se lo ha dividido en tres grupos el grupo *sericea*, el grupo *reticulata* y el complejo *incana*. El grupo *sericea* incluye especies cuyas hojas contienen varios pares de foliolos y tricomas serisioso en el envés, sus foliolos son ovales, enteros o aserrados con ápices agudos u obtusos. Las especies del grupo *reticulata* tienen foliolos nítidos, elípticos fuertemente emarginados en el ápice. Los miembros del complejo *incana* tienen un número variable de pares de foliolos ovoides, crenados y atenuados en la base, el envés de los foliolos normalmente posee tricomas granulares con una cubierta lanosa (Robertson, 1974; Simpson, 1979).

Características de *Polylepis pauta*

Los árboles de *Polylepis pauta* (Figura 1.2) se caracterizan por medir entre 5 a 27 m de altura. Sus hojas se aglomeran ligeramente al final de las ramas, son imparipinnadas con 4 a 9 pares de foliolos, con un ancho de 2,4 a 6,6 cm y 3,4 a 11,7 cm de largo, además de presentar un raquis lanoso. En la parte de unión de los pecíolos existen tricomas (largos, multicelulares, glandulares, exudantes de resina) y vainas estipulares sericiosas en la superficie exterior de color rojo-café. Los foliolos son ovalados, agudos en el ápice, oblongos o lanceolados en sus contornos con márgenes aserrados con una superficie es sericiosa con tricomas blancos o dorados completamente restringidos a las nervaduras. Las inflorescencias son colgantes (6 a 21 cm de largo) con 16 a 60 flores. Las brácteas florales son conspicuas, pilosas en la superficie externa y con raquis sericeos. Las flores son perfectas de 0,3 a 0,6 cm de diámetro, las cuales poseen de 3 a 4 sépalos (ovales, verdes, con la superficie externa sericeosa), de 5 a 15 estambres (rojos, sericeos con estigma expandido) y un estilo hispido en la base. Los frutos tienen forma irregular, romboide o cilíndrica con numerosas espinas delgadas de 0,3 a

1,4 cm de ancho y 0,3 a 1,2 cm de largo. Esta especie florece y fructifica en los meses de febrero, mayo, julio, agosto, septiembre y diciembre (Romoleroux, 1996; Simpson, 1979; Schmidt & Kessler, 2006).

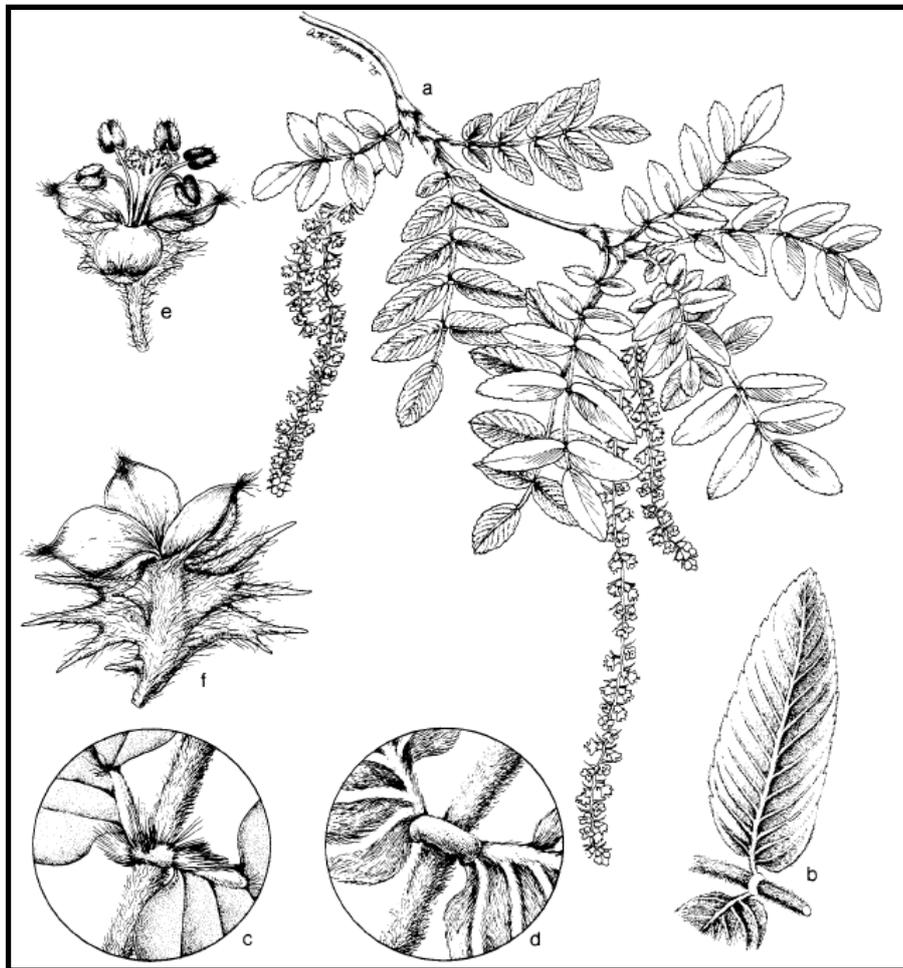


Figura 1.2 Características morfológicas de *P. pauta*. a) rama, b) envés de hoja, c) parte superior del punto de unión de foliolo, d) parte inferior del punto de unión de foliolo, e) flor, f) fruto (Simpson, 1979).

P. pauta exhibe muchos caracteres no especializados como son el tamaño de las plantas (árboles grandes y delgados), la cantidad de foliolos y largas inflorescencias con numerosas flores. Esta especie parece crecer usualmente mezclada con bosque montano o en la parte superior del mismo. Algunos especímenes han sido encontrados a elevaciones tan bajas como los 1800 msnm, siendo esta la elevación más baja registrada para una especie de este género dentro de los trópicos. *P. pauta* se distribuye (Figura 1.3) desde el centro norte del Ecuador (Pichincha), en Perú (Cuzco), hasta el norte de

Bolivia, principalmente en el este de los Andes (Romoleroux, 1996; Simpson, 1979; Schmidt & Kessler, 2006).

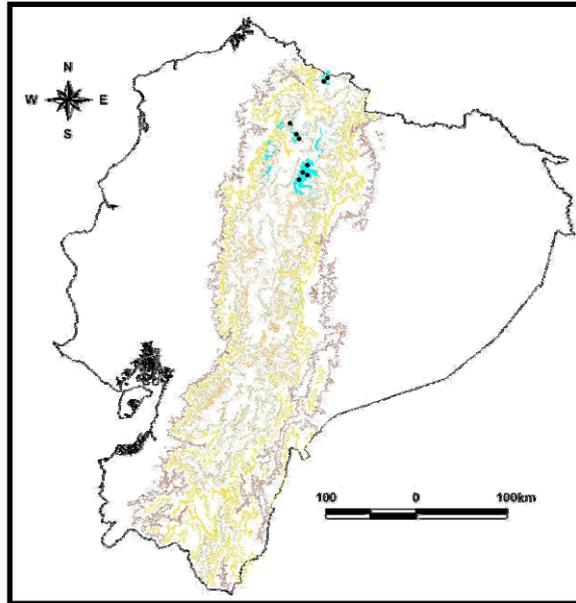


Figura 1.3 Distribución geográfica potencial de *P. pauta* en el Ecuador (Segovia, 2006).

Características de *Polylepis incana*

Los árboles de *Polylepis incana* se caracterizan por medir entre 5 a 8 m de altura. Las hojas se concentran al final de las ramas, son imparipinadas con un par de foliolos (de 1,4 a 3,9 cm de ancho y 1,9 a 6,4 cm de largo). En los raquis y en la unión de los pecíolos se encuentran tricomas granulares multicelulares que exudan resina. Los foliolos tienen una forma ovoide (de 0,4 a 1,4 cm de ancho y 1,2 a 4,0 cm de largo) con márgenes crenados, ápice obtuso algo emarginado. El haz de los foliolos es liso, y su envés está densamente cubierto por tricomas multicelulares irregulares con un exudado resinoso. Las inflorescencias son colgantes de 2 a 7 cm de largo con 3 a 10 flores y posee un raquis con tricomas exudantes. Las brácteas florales son delgadas y lanceoladas, lisas o pilosas en la superficie externa. Las flores son perfectas de 0,3 a 0,7 cm de diámetro, las cuales poseen 3 sépalos (ovales, con la superficie externa cubierta de tricomas multicelulares), de 8 a 24 estambres, anteras orbiculares y una base del estilo vellosa. Los frutos son fusiformes, irregularmente alados, con alas de 0,2 a 0,7 cm de ancho y 0,2 a 0,5 cm de largo, tal como se ilustra en la figura 1.4.

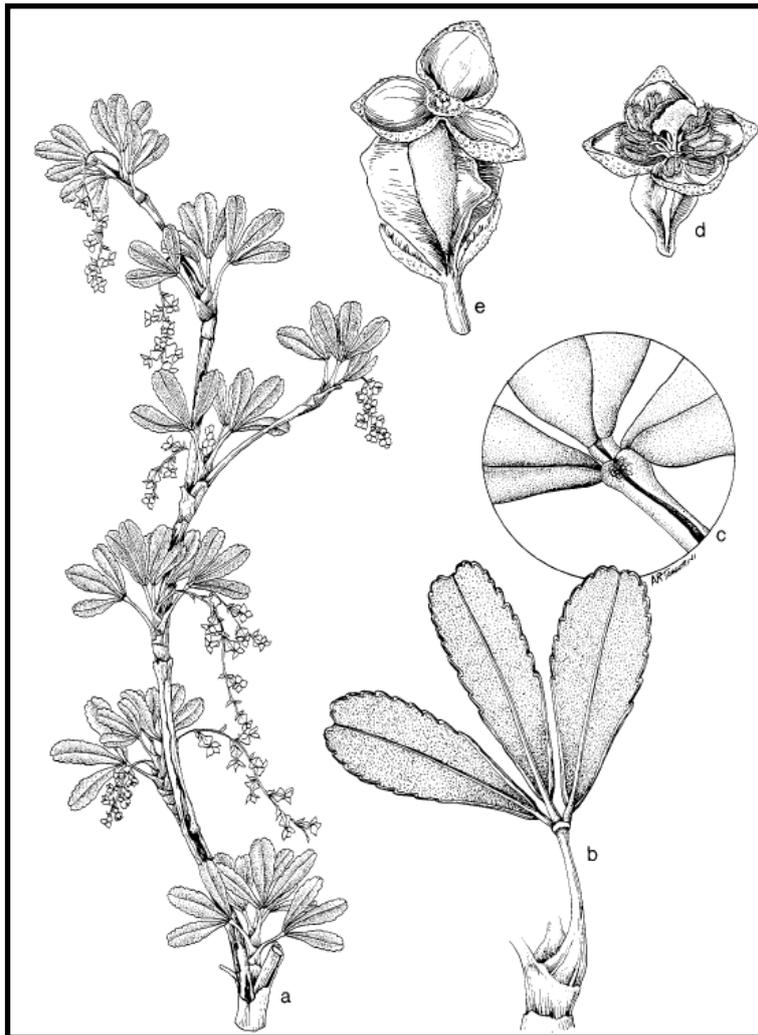


Figura 1.4 Características morfológicas de *P. incana*. a) rama, b) envés de hoja, c) parte superior del punto de unión de foliolo, d) fruto, e) flor (Simpson, 1979).

P. incana florece y fructifica en los meses de enero, mayo, junio y de agosto a noviembre. Esta especie forma el centro de un complejo de especies, muchas de las cuales parecen hibridizarse entre sí. Esta especie se distribuye (Figura 1.5) desde el centro norte del Ecuador (Pichincha) hasta el sur de Perú (Cuzco) (Romoleroux, 1996; Simpson, 1979; Schmidt & Kessler, 2006).

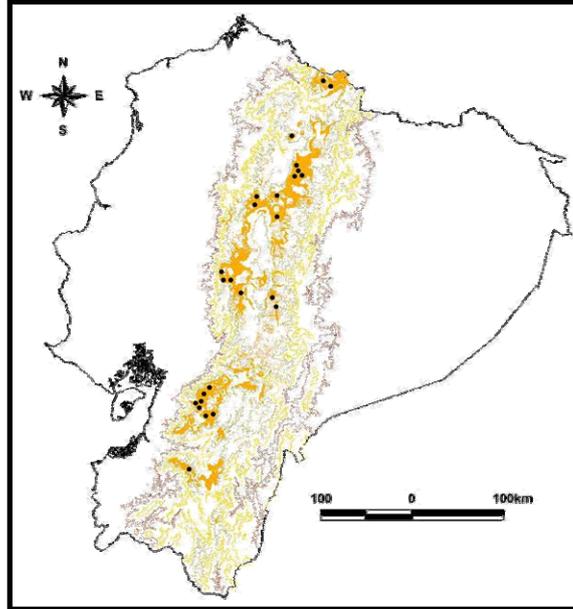


Figura 1.5 Distribución geográfica potencial de *P. pauta* en el Ecuador (Segovia, 2006).

1.4.1.3 Distribución geográfica

Algunas especies como *P. multijuga*, *P. pauta* y *P. hieronymi* crecen en elevaciones bajas y tienden a tener menos adaptaciones especializadas que aquellas especies que forman bosques en elevaciones entre 4000 a 5200 msnm. En áreas tropicales sobre los 3600 msnm se presentan variaciones extremas, las temperaturas en la noche frecuentemente se encuentran bajo el punto de congelación mientras que al medio día la temperatura oscila entre 10 a 12°C todo el año. Este régimen climático ocasiona que la capa interna del suelo se encuentre a una temperatura constante de 2 a 5°C, sin embargo los árboles de este género permanecen activos todo el año. El crecimiento de los árboles se ve influenciado por el viento (constante y seco) y las temperaturas diurnas de congelación que inhabilitan a las raíces en la absorción de nutrientes en los niveles bajos del suelo, los cuales no son calentados durante el día (Pulgar, 1967). La habilidad de *Polylepis* de crecer sobre los bosques montanos puede ser explicada por la presencia de microclimas que reproducen condiciones de elevaciones más bajas. Este fenómeno incluye la formación de capas de nubes especialmente en la noche y algunos declives a lo largo de áreas de drenaje, los cuales previenen el congelamiento nocturno del suelo. Los bosques de *Polylepis* se restringen a ciertas áreas como declives rocosos, cursos de ríos, valles y pendientes normalmente cubiertos por nubes (Walter & Medina, 1969).

En Ecuador y Perú no solo se han encontrado taxones poco especializados y de poca altitud sino otros muy especializados en mayores elevaciones. Tomando en cuenta que estos grupos de especies no están cercanamente relacionados unos con otros, parece que han existido muchas corrientes de colonización de norte a sur a lo largo de la cordillera de los Andes y por ende la diferenciación no ha sido vertical. La distribución geográfica actual de cualquier especie en particular es prácticamente imposible de determinar por varias razones. Primero, las colecciones son escasas y tienden a concentrarse solo en áreas accesibles, debido a las altas elevaciones y microhábitats especializados en los que estas especies se desarrollan. En segundo lugar, estos árboles han sido utilizados desde tiempos prehistóricos como leña y material de construcción por el hombre. Además con la reciente expansión de las poblaciones en los Andes ha aumentado la deforestación. Estos factores combinados producen un aparente patrón de distribución de este género, el cual difiere en gran medida de la distribución original descrita (Simpson, 1975).

1.4.1.4 Función ecológica

Los parches de *Polylepis* cumplen una importante función ecológica como oasis biológicos en las monótonas pasturas de los páramos. Muchas corrientes y manantiales tienen agua permanente sólo mientras las laderas superiores tienen una cubierta vegetal densa (Figura 1.6), debido a que los bosques detienen la escorrentía en la vegetación y tienen la capacidad de liberar el agua gradualmente, dejándola filtrar dentro del suelo (Hamilton, 1987; Smiet, 1987). En las regiones áridas la vegetación puede consumir más agua de la que está almacenada y así reducir el agua que está disponible, pero en regiones con bosques nublados el efecto esponja es positivo. Hay una relación directa entre la presencia de bosques y el abastecimiento de agua de buena calidad. El agua de lluvia se filtra a través del suelo orgánico del bosque, donde muchas impurezas son retenidas y los componentes orgánicos son usualmente degradados por microorganismos. Así, el manantial o la corriente debajo del bosque tiene agua pura libre de sedimentos y potable (Cevallos, 1997; Fjeldsa y Kessler, 2004)



Figura 1.6 Fotografía de un bosque de *Polylepis* en la parte superior de la laguna de Mojanda, la cual se localiza a 3787 msnm, 078°15.570'O y 00°07.246'S (Ochoa, 2006).

Mediante el almacenamiento y la detención de la escorrentía, los bosques reducen los picos de flujo que de otro modo causarían problemas río abajo. El agua adicional en el invierno pocas veces puede ser utilizada, pero puede lavar los suelos de las tierras cultivadas. Gran parte de los Andes tiene un alto riesgo de erosión del suelo, lo cual ha reducido fuertemente la productividad del área. La erosión es especialmente severa en áreas con fluctuaciones definidas entre época seca y lluviosa donde al final de la época seca el suelo queda expuesto a las lluvias torrenciales (Morgan, 1986) del invierno, que arrastran consigo la capa orgánica del suelo.

La zona ecológica donde crece *Polylepis* se caracteriza por una radiación solar extrema durante el día y heladas regulares por las noches. Sin embargo, el dosel del bosque retiene la radiación nocturna proveniente del suelo y así el interior de los parches de bosques normalmente está libre de heladas. El efecto de esto se revela claramente en la abundante vegetación de hierbas y enredaderas dentro de estos bosques, pudiendo encontrarse plantas comestibles como mashua y plantas medicinales como valeriana. El clima moderado del bosque permite la siembra en sistemas de agroforestería, de muchos tubérculos y cereales a elevaciones por encima de los 4000

msnm. Otro efecto marcado, de los microclimas generados por *Polylepis* es el comportamiento sedentario incluso durante las nevadas de las aves que habitan los bosques alto andinos como es el caso de *Oreomanes fraseri* (Fjeldsa, 1991). Existe además la presencia constante de venados, conejos y otros animales en estos parches de bosque.

A pesar de lo mencionado anteriormente la importancia de los bosques de *Polylepis* a veces es indirecta y difícil de expresar en términos cuantitativos. No existen estudios para documentar el balance óptimo entre parches de bosque y terrenos manejados sutil o fuertemente (Fjeldsa y Kessler, 2004). Estos estudios son importantes para sustentar la conservación del bosque alto andino que actualmente están siendo afectados por diversas actividades humanas.

1.4.1.5 Destrucción de los bosques

La cubierta forestal a nivel mundial alcanza casi 4000 millones de hectáreas y cubre cerca del 30% de la superficie terrestre. Entre 1990 y 2005, el mundo perdió el 3% de su superficie forestal, con una reducción media del 0,2% anual. La pérdida neta de los bosques se sitúa en los 7,3 millones de hectáreas anuales, lo que implica unas 20000 hectáreas diarias. América Latina tiene los índices más altos de deforestación entre el 2000 y 2005, alrededor de 4,3 millones de hectáreas por año (FAO, 2005). Por su parte, el Ecuador cuenta con aproximadamente 11,5 millones de hectáreas cubiertas de bosques, los cuales representan el 42% del área total del país. El 80% de los bosques se encuentran en la región amazónica, el 13% en el litoral y el 7% en la serranía. Se estima que la tasa anual de deforestación varía entre 140000 y 200000 hectáreas al año, lo que sitúa al país en una de las tasas más altas de deforestación en América Latina. Si esta situación se mantiene, de acuerdo a los cálculos el Ecuador quedaría totalmente deforestado en el año 2050 (Ministerio de relaciones exteriores del Ecuador, 2005).

Actualmente, los bosques de *Polylepis* se están perdiendo poco a poco debido a diversas actividades antropogénicas. Estos bosques han disminuido notablemente en los últimos años, llegando a un punto en el que actualmente no se encuentran parches registrados años atrás (Kessler, 2002). La principal causa para la pérdida de los bosques de *Polylepis* radica en que la principal preocupación para los habitantes de las zonas andinas es conseguir los medios necesarios para mejorar sus condiciones de vida. Por ello, la conservación de la diversidad biológica es secundaria a su lucha diaria por sobrevivir, debido a que no comprenden el valor indirecto de estos bosques. La madera de *Polylepis* es muy apreciada porque resiste a la humedad y da lugar a carbón de buena calidad (Kessler y Driesch, 1994). Además, los bosques son sometidos constantemente a incendios para regenerar los pastos útiles para el ganado y ovejas. Ciertos árboles maduros sobreviven a los incendios al estar protegidos por su corteza, mientras que las plántulas mueren fácilmente, limitándose la regeneración del bosque (Fjedsa y Kessler, 2004). La mayoría de los bosques tropicales andinos se caracterizan por tener una distribución discontinua formando parches. Los mecanismos para la regeneración natural en las zonas transitorias entre los parches de bosque y la paja del páramo son todavía poco entendidos (Cierjacks, Iglesias, & Hensen, 2007a). Generándose así, la destrucción y fragmentación permanente de estos bosques.

La fragmentación del hábitat se está incrementando alrededor del mundo y tiene muchas consecuencias importantes tanto ecológicas como genéticas para las poblaciones de plantas endémicas. En general, las especies de plantas en áreas fragmentadas pueden experimentar una reducción de su hábitat y del tamaño de la población, como también alteraciones potenciales en el servicio de los polinizadores y dispersión de las semillas (Kwak, Velterop & Andel, 1998). Con el tiempo, esto puede llevar a un incremento de la autofertilización, disminución del éxito reproductivo y alteraciones en el flujo génico (Ellstrand & Elam, 1993). Consecuentemente, las poblaciones aisladas pueden experimentar pérdida de la variación genética, incremento de la diferencia entre poblaciones y deriva genética (Young, Boyle, & Beown, 1996). Después de un largo tiempo, la fragmentación puede reducir la habilidad de las poblaciones de adaptarse a los cambios medio ambientales, incrementando así los procesos locales de extinción (Culley *et al.*, 2007).

1.4.2 Dinámica de poblaciones

1.4.2.1 Estructura genética

La diversidad biológica son todos los organismos vivos, su material genético y los ecosistemas de los cuales forman parte. Usualmente se la describe con tres niveles: genético, especies y diversidad de ecosistemas. La diversidad genética es la variedad de genes entre y dentro de las especies. La diversidad genética dentro de las especies les permite adaptarse a los individuos para defenderse de nuevas plagas y enfermedades, ajustarse a los cambios en el ambiente, el clima y los métodos agrícolas. A pesar de la extraordinaria biodiversidad existente alrededor del mundo, las acciones y programas para prevenir su pérdida son necesarios. Se deben considerar algunos de los factores (flujo génico, extensión de ecosistemas, actividades antropogénicas) que causan y mantienen la biodiversidad. Mediante la integración de los datos geográficos de distribución, tiempo de divergencia evolutiva y estructura genética (documentada por análisis de ADN) (Sibley & Ahlquist, 1990), se puede conocer el estado de la biodiversidad de los ecosistemas y variabilidad de las poblaciones. Se considera como población a un grupo de individuos de una especie que viven en la misma zona geográfica y en el mismo periodo tiempo (Solomon, Berg, y Martin, 2001).

La información acerca de la historia evolutiva de las especies es frecuentemente invaluable para interpretar los patrones biogeográficos o clarificar las diferencias taxonómicas. Esto es particularmente verdad para localizar u ordenar poblaciones ampliamente distribuidas, especies complejas de poca edad o grupos con pocas distinciones morfológicas (Schiemann, Tyler, & Widen, 2000). Los sucesos que llevan a estos patrones biogeográficos pueden no ser evidentes, sin embargo los patrones genéticos pueden proveer datos en la historia evolutiva de las especies, sus poblaciones y las indicaciones de los procesos involucrados (Scheen *et al.*, 2002).

Las preguntas biogeográficas o taxonómicas se enfocan principalmente en poblaciones marginales. Las poblaciones marginales pueden resultar de procesos variantes incluyendo dispersiones de gran rango, mantenimiento de refugio, o

restricción de hábitats edáficos específicos (Schiemann *et al.*, 2000). Estas poblaciones son frecuentemente objeto de medidas de conservación incluso si la especie en cuestión es común en otra zona geográfica. Para ello, hay razones geopolíticas como el mantenimiento de una especie en una región particular o razones biológicas como la protección de presuntos genotipos locales adaptados (Lesica & Allendorf, 1995). Tomando en cuenta la importancia de las poblaciones marginales para la protección e implementación de decisiones apropiadas, las preguntas más urgentes para las investigaciones iniciales de conservación genética son tal vez: cómo la diversidad genética se distribuye través de las especies y cómo están relacionadas las poblaciones (Qamaruz-Zaman *et al.*, 1998). Últimamente, el conocimiento de la estructura genética de las poblaciones con las interrelaciones de las características del lugar, parámetros históricos y diferenciación genética provee invaluable información para la formulación de políticas de protección y administración efectivas para especies en peligro (Iglesias y Casas, 2004; McCauley *et al.*, 2002).

La estructura de una población puede ser conocida mediante la combinación de métodos que describan las características actuales y entonces se interpretan como el reflejo de la historia de las especies, por ejemplo como resultado de índices pasados de contracciones y expansiones en respuesta a cambios climáticos. Las respuestas comunes que se obtienen son la identificación de áreas de refugio, la fuente de (re)colonización de otras áreas y la distinción entre la varianza antigua y la dispersión actual. Adicionalmente, la observación de la distribución de la diversidad genética (se asume que es mayor en las áreas refugio, pero también en zonas de reunión) y la distribución de los marcadores individuales provee alguna información extra. Así, por ejemplo, los fragmentos exclusivos de una población (o región) pueden ser contados y un gran número de estos fragmentos aislados indica antigua divergencia (Bonin, Eric & Manel, 2007).

La estructura genética de una población concreta viene determinada por la historia evolutiva de esa población y va a ser consecuencia de las interacciones entre varios factores que condicionan la evolución de las poblaciones: mutación, deriva genética, flujo génico, sistema de reproducción y selección natural (Scheen *et al.*, 2002)

Mutaciones

Las mutaciones son cambios en la secuencia del ADN del genoma. Las mutaciones son la fuente de todos los nuevos alelos y son causadas por: un cambio en los pares de bases nucleotídicas de un gen, una transposición de genes en los cromosomas de modo que sus interacciones producen diferentes efectos, o un cambio en los cromosomas. La variación se introduce en un acervo genético a través de mutaciones, que son un cambio impredecible en el DNA. Las mutaciones ocurren de manera impredecible y espontánea. Al parecer, la frecuencia de mutación es relativamente estable para un gen específico, pero varía en diversos órdenes de magnitud entre genes de una especie determinada y entre diferentes especies (Lewin, 2001).

Las mutaciones pequeñas, incluso las que tienen efectos fenotípicos poco relevantes, presentan probabilidades de incorporarse a la población, donde en un momento posterior, en condiciones ambientales difíciles podrían producir rasgos útiles o adaptativos. Las mutaciones no determinan el sentido del cambio evolutivo, para ello consideremos el ejemplo de una población que vive en un ambiente cada vez más seco. Una mutación que produzca un nuevo alelo que ayude a un individuo a adaptarse a condiciones secas no ocurre con más probabilidad que otra que confiera ventajas para adaptarse a condiciones de humedad. La diferencia es que el alelo que permite adaptarse a condiciones secas tendrá mayor probabilidad de fijarse a la población (Biggs, Kapicka y Landgren, 2003). La producción de nuevas mutaciones solo aumenta la variabilidad genética sobre la que puede actuar la selección natural y, por tanto, el potencial de nuevas adaptaciones (Campbell, Mitchell y Reece, 2001).

Deriva génica

La deriva génica es un proceso a través del cual, el tamaño de la población puede afectar a la frecuencia en la que un mutante está presente e influir en la diversidad genética de una población. Las poblaciones grandes tienen normalmente una mayor diversidad génica que las poblaciones pequeñas, debido a que las tasas de mutación son relativamente constantes y casi siempre bastante bajas. Por tanto, el tamaño de una

población tiene efectos importantes en las frecuencias alélicas, por acontecimientos aleatorios o fortuitos, que tienden a causar cambios mayores en una población pequeña (Lewin, 2001). Un alelo puede eliminarse al azar en una población, independientemente de si el alelo es beneficioso, perjudicial o carente de ventaja o desventaja específica. De este modo, la deriva genética reduce la variación genética dentro de una población, aunque tiende a incrementar las diferencias genéticas entre distintas poblaciones. La deriva genética ocurre cuando una población se ve sometida a un cuello de botella o a un efecto fundador, circunstancias en las que la frecuencia de los alelos mutantes en las poblaciones supervivientes o fundadoras puede diferir significativamente de la frecuencia de la población original (Nason, 1976).

Debido a fluctuaciones ambientales, como agotamiento del alimento o el brote de alguna enfermedad, una población puede experimentar en forma periódica un rápido y considerable descenso en la cantidad de individuos. En estos casos se dice que la población pasa por un cuello de botella genético, en el cual, puede ocurrir deriva génica en la pequeña población de sobrevivientes. Cuando la población vuelve a aumentar de tamaño, es posible que las frecuencias de muchos alelos sean muy distintas de las que había en la población previa a la declinación (Solomon *et al.*, 2001).

En otro caso, cuando uno o unos pocos individuos de una población grande establecen o fundan una colonia, llevan consigo solo una pequeña parte de la variación genética presente en la población original. Como resultado, los únicos alelos representados entre sus descendientes serán los pocos que los colonizadores poseían. Las frecuencias alélicas, en la población recién fundada, suelen ser muy distintas de las que se observan en la población original. La deriva génica que resulta cuando una pequeña cantidad de individuos de una población grande colonizan una nueva región se denomina efecto fundador (Biggs *et al.*, 2003).

Flujo génico

El flujo génico es el proceso mediante el cual determinados alelos (genes) o individuos (genotipos) son intercambiados entre poblaciones separadas geográficamente. Los miembros de una especie tienden a distribuirse en poblaciones locales más o menos aisladas genéticamente de otras poblaciones. Puesto que cada población está separada de otras poblaciones de la especie, tiene distintos rasgos genéticos y distinto acervo genético. Según este planteamiento, el flujo génico puede incrementar sustancialmente el tamaño de una población a través del intercambio de genes y genotipos, lo cual facilita el movimiento de alelos mutantes entre poblaciones (Bernstein & Bernstein, 2003) e incrementa la variabilidad de las mismas.

Sistemas de reproducción

Los organismos se reproducen de diversas maneras. Comúnmente, los individuos producen gametos los cuales posteriormente se fertilizan. En algunas especies no existe este proceso, por lo que al no haber fertilización la meiosis no es necesaria y por lo tanto no se da la mezcla de dos genomas diferentes. Esta reproducción es llamada vegetativa, la cual se las plantas, produciéndose individuos idénticos a los padres. Este fenómeno tiene consecuencias evolutivas muy interesantes porque no permite la recombinación genética. De igual manera, si la reproducción es sexual entonces dependiendo del tipo de apareamientos las consecuencias evolutivas serán diferentes (Biggs *et al.*, 2003).

En muchas poblaciones, son más frecuentes los apareamientos entre vecinos cercanos que entre miembros más distantes de la población. Como resultado, los vecinos tienden a estar más emparentados entre sí. El apareamiento de individuos con similitudes genéticas y una relación más cercana, que si se hubieran reunido al azar entre la población completa, se conoce como endogamia (Solomon *et al.*, 2001). La homocigosidad aumenta con cada generación sucesiva de endogamia. El ejemplo más extremo de ésta es la autofecundación, proceso muy común en plantas. La endogamia no parece ser perjudicial en algunas poblaciones, pero en otras ocasiona depresión endogámica, en la cual los individuos endogámicos tienen menor aptitud que los no

endogámicos. Se piensa que tal depresión, que se manifiesta como descenso de la fecundidad y alta mortalidad de los juveniles, se debe a la expresión de alelos recesivos nocivos a medida que la homocigosidad aumenta con la endogamia (Bernstein & Bernstein, 2003). Por otro lado, la polinización anemófila permite una la dispersión del polen (material genético) por grandes distancias permitiendo un amplio flujo de genes (Lindgren *et al.*, 1995), lo que da lugar a que los apareamientos no se den únicamente entre vecinos cercanos

Selección natural

La selección natural es el mecanismo evolutivo por el cual los miembros de una población que poseen adaptaciones más exitosas al ambiente tienen mayor probabilidad de sobrevivir y reproducirse. La selección natural conduce al cambio evolutivo adaptativo, como resultado, una población se adapta mejor a su ambiente. La selección natural no solo explica por qué los organismos están bien adaptados al ambiente en que viven, sino que también ayuda a explicar la notable diversidad de la vida. La selección natural preserva los individuos con genotipos favorables y elimina los individuos con genotipos desfavorables (Campbell *et al.*, 2001).

El proceso de selección natural que se asocia con una población bien adaptada a su ambiente se conoce como selección estabilizadora. Es probable que la mayor parte de las poblaciones estén bajo la influencia de fuerzas estabilizadoras casi todo el tiempo. Este tipo de selección actúa contra los extremos fenotípicos; en otras palabras, son favorecidos los individuos con fenotipo intermedio (Lindgren *et al.*, 1995). Como la selección estabilizadora tiende a reducir la variación al favorecer a los individuos que se encuentran cerca de la media de la curva de distribución normal, a expensas de los que se encuentran en los extremos, la campana se hace más estrecha. Si bien esta forma de selección reduce la cantidad de variación en una población, rara vez se elimina por este proceso, porque otros procesos microevolutivos actúan contra un decremento de la variación (Biggs *et al.*, 2003).

La selección natural induce cambios en los tipos y las frecuencias de los alelos en las poblaciones solo si hay variación hereditaria preexistente. La variación genética es la materia prima para el cambio evolutivo, ya que ofrece la diversidad sobre la cual puede actuar la selección natural. Sin variación genética, la evolución no es posible. Entonces la evolución en si aparece, como una compleja mezcla de flujo génico, selección natural y artificial y efectos locales de aislamiento (Cassasoli *et al.*, 2001).

1.4.2.2 Evolución y equilibrio de Hardy-Weinberg

La evolución puede definirse como la acumulación de cambios hereditarios en el transcurso del tiempo. Los rasgos hereditarios son de tipo genético y por tanto susceptible de transmitirse a la descendencia de la población. El término evolución no se refiere a cambios que ocurren en un organismo individual durante su vida, sino a cambios en las características de las poblaciones en el lapso de muchas generaciones. Tales cambios pueden ser tan pequeños que resulte difícil detectarlos (Figura 7.1), o tan grandes, que la población difiera de manera notable de la población ancestral. Con el tiempo, dos poblaciones pueden divergir en tal grado que se las considere especies distintas (Biggs *et al.*, 2003).

Cada población posee un acervo genético, que consiste en el material genético total de todos los individuos que la constituyen e incluye todos los alelos para todos los genes presentes en la población. La variación genética que es evidente entre los individuos de una población determinada indica que cada individuo tiene una combinación distinta de alelos del acervo genético (Nason, 1976). La evolución de las poblaciones se comprende mejor en términos de frecuencias alélicas. Una frecuencia alélica es el porcentaje de un alelo específico de un locus genético dado en la población. Si tales frecuencias permanecen constantes de una generación a la siguiente, la población no está experimentando cambio evolutivo, y se dice que está en equilibrio genético. Sin embargo, los cambios en las frecuencias alélicas en generaciones sucesivas indican que ha ocurrido evolución (Bernstein & Bernstein, 2003).

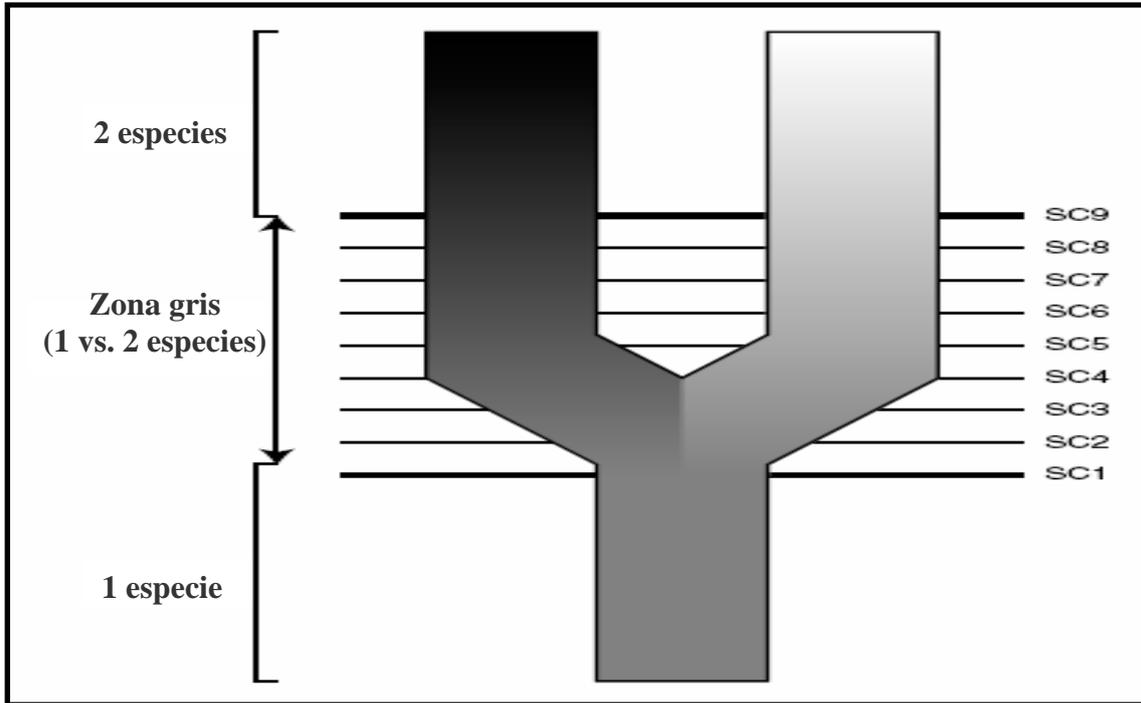


Figura 1.7 Se presenta un único linaje (especie) que se divide para formar dos linajes. La degradación del color gris representa a los linajes hijos que divergen y las líneas horizontales (criterio de especies) representan los períodos en el cual adquieren diferentes propiedades. Todas las propiedades forman una zona gris dentro de la cual conceptos alternativos de especie llegan a conflicto. Antes de la adquisición de la primera propiedad, todos estarán de acuerdo que es una sola especie, y después de la adquisición de la última propiedad todos estarán de acuerdo que hay dos (Queiroz, 2007).

La evolución representa un alejamiento respecto al principio de Hardy-Weinberg de equilibrio genético. El grado de desviación entre las frecuencias alélicas o genotípicas observadas y esperadas con respecto al principio de Hardy-Weinberg indica la cantidad de cambio evolutivo. Este tipo de evolución (cambios de una generación a otra en las frecuencias alélicas o genotípicas dentro de una población) a veces recibe el nombre de microevolución, por que implica cambios menores o relativamente poco numerosos, por lo común en unas pocas generaciones (Campbell *et al.*, 2001).

Se dice que una población cuyas frecuencias alélicas y genotípicas no cambian de una generación a la siguiente está en equilibrio genético. Esto fue propuesto por Godfrey Hardy y Wilhelm Weinberg. Ellos señalaron que las frecuencias esperadas de diversos genotipos en una población pueden describirse de manera matemática. El principio de Hardy-Weinberg resultante demuestra que en poblaciones grandes el proceso de la herencia no causa por si mismo cambios en las frecuencias alélicas.

También explica por qué los alelos dominantes no son necesariamente más comunes que los recesivos en una población. Tal principio representa una situación ideal que tal vez nunca se presenta en la naturaleza. A pesar de ello, es útil por qué constituye un modelo que nos ayuda a comprender el mundo real. Así, conocer el principio de Hardy-Weinberg es esencial para comprender los mecanismos del cambio evolutivo en poblaciones que se reproducen sexualmente (Campbell *et al.*, 2001).

Cualquier población en la cual la distribución de genotipos se ajuste a la relación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, sin importar los valores absolutos de p y q , se encuentra en equilibrio genético. El principio de Hardy-Weinberg del equilibrio genético nos dice que esperar cuando una población que se reproduce de manera sexual no está evolucionando. La proporción de alelos en generaciones sucesivas siempre será la misma (Lindgren *et al.*, 1995).

1.4.3 Técnicas moleculares

1.4.3.1 Extracción y cuantificación de ADN

El aislamiento del ADN es una técnica esencial en biología molecular. Esta técnica ha cobrado mucha importancia por la creciente demanda de análisis de ADN.

El propósito del aislamiento del ADN es separar el material genético de todos los componentes celulares (agua, iones inorgánicos, aminoácidos, nucleótidos, lípidos, proteínas y RNA) para obtener una preparación homogénea de ADN, que represente toda la información genética contenida en la célula. Existen varios métodos para el aislamiento de ADN, en general todos ellos constan de cuatro pasos esenciales que son la ruptura celular, remoción de proteínas y ARN, concentración de ADN y determinación de la pureza y concentración del ADN (Surzycki, 1999).

Ruptura celular

La ruptura de la membrana celular es uno de los pasos más importantes en el aislamiento de ADN. Los procedimientos para romper las células son químicos, mecánicos y enzimáticos. Los métodos mecánicos incluyen a la sonicación, molienda, licuado o alta presión, sin embargo su aplicación puede causar la fragmentación del ADN. Los mejores procedimientos para abrir las células y obtener ADN intacto son a través de la aplicación de químicos (detergentes) y/o enzimas. Los detergentes pueden solubilizar los lípidos de la membrana celular resultando en una gentil lisis celular. En ciertos casos las células no se rompen únicamente con detergente, por lo que es necesario un tratamiento inicial con enzimas, el cual permite que el detergente actúe sobre la membrana celular (Surzycki, 1999).

Remoción de proteínas y ARN

El segundo paso en la purificación es la remoción de proteínas y ARN del lisado celular. La remoción de proteínas de la solución de ADN depende de las diferencias físicas entre las propiedades de los ácidos nucleicos y proteínas. Los métodos de desproteínización explotan estas diferencias mediante el uso de solventes orgánicos (diferencia en solubilidad), gradientes de densidad (diferencias en volumen específico) y proteinasas (sensibilidad a enzimas digestivas). La remoción del ARN de las preparaciones de ADN se lleva a cabo usando procedimientos enzimáticos (RNasa) (Surzycki, 1999).

Concentración de ADN

Este paso de la purificación de ADN tiene dos propósitos. Primero concentrar el ADN de la solución de desproteínización y segundo remover las impurezas que permanecen en la solución producto de la lisis celular. Este paso puede ser implementado de dos maneras: precipitando el ADN con alcoholes o con diálisis al concentrar el ADN usando compuestos que absorban el agua (Dellaporta, 1983).

Determinación de la pureza y cantidad de ADN

El último paso en cualquier procedimiento de aislamiento de ADN es la evaluación de los resultados, el cual se realiza al determinar la pureza y concentración del ADN. Este tipo de determinaciones se las puede realizar mediante espectrofotometría UV, fluorimetría y comparación de la intensidad de bandas en geles de agarosa. En espectrofotometría se conoce la concentración de ADN a partir de la medida de absorbancia a una longitud de onda de 260 nm y se conoce la pureza al comparar la lectura de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (propia de las proteínas). En fluorimetría la concentración se calcula a partir de la fluorescencia emitida por fluoróforos fijados en el ADN, la cual se compara con patrones estándar (Surzycki, 1999). Mientras que en los geles de agarosa electroforesis se compra la muestra de ADN con marcadores de peso molecular útiles para cuantificación y la determinación de la pureza.

1.4.3.2 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

La electroforesis es una técnica analítica de separación de macromoléculas. La separación tiene lugar debido a la diferente movilidad que presentan las macromoléculas cargadas cuando son sometidas a la influencia de un campo eléctrico. Durante la electroforesis solo los iones positivos hidratados, normalmente asociados con los grupos aniónicos fijados de la agarosa, pueden moverse hacia el cátodo. El agua por lo tanto es empujada con estos iones positivos hacia el electrodo negativo y las moléculas negativas, como el ADN, migran hacia el electrodo positivo. El índice de migración del ADN a través de los geles de agarosa depende del tamaño de la molécula, concentración del gel, voltaje aplicado, conformación del ADN y buffer usada (Técnicas de Biología Molecular, 2001).

Las moléculas de ADN migran en el gel de electroforesis en un índice inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular o número de pares de bases. El rango de movilidad lineal depende de la concentración del gel y el voltaje aplicado. Un

fragmento de ADN de un determinado tamaño migra con índices diferentes en geles que contienen diferentes concentraciones de agarosa. Usando geles de diferentes concentraciones, es posible distinguir fragmentos de diferente tamaño en un amplio rango, si se aplica un voltaje correcto al gel. Normalmente el índice de migración de los fragmentos de ADN es directamente proporcional al voltaje aplicado. Consecuentemente, la fuerza de campo aplicada en la mayoría de geles debe ser entre 0,5 V/cm y 10 V/cm.

La forma del ADN (conformación) también influye en su índice de migración. Existen tres estados conformacionales del ADN que son el circular cerrado superenrollado, circular abierto con moléculas relajadas y lineal. La movilidad relativa de estas tres formas depende de la concentración del gel, del voltaje aplicado y la fuerza iónica de la buffer. Como regla general, en la buffer TAE (Tris-acetato EDTA) las diferentes formas de ADN migran (de la más lenta a la más rápida) en este orden: lineal superenrollado y circular relajado. Mientras que en la buffer TBE (Tris-borato EDTA) el orden es el siguiente: relajado circular, lineal y superenrollado (Surzycki, 1999).

Finalmente, para visualizar el ADN en los geles de agarosa se utiliza bromuro de etidio. El bromuro de etidio se une a los ácidos nucleicos al intercalarse entre las bases nitrogenadas. El bromuro de etidio absorbe la radiación ultravioleta en una longitud de onda entre 302 y 366 nm y la reemite como una fluorescencia de una longitud de onda de 590 nm. Mediante fotodocumentadores es posible ver el ADN en estos geles y almacenar digitalmente esta información.

1.4.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy valiosa, ya que permite obtener una gran cantidad de copias de fragmentos de ADN *in vitro*, duplicando sólo secuencias deseadas específicas. Los componentes para una reacción estandar de PCR son: la polimerasa termoestable (enzima que replica el ADN), un templado de ADN, primers (fragmentos que señalan las secuencias a duplicarse),

desoxirridonucleósidos trifosfato (sustrato), $MgCl_2$ (cofactor enzimático) y sales (estabilizadores de la enzima) (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

El fundamento de la técnica de la PCR es la repetición cíclica de tres reacciones que varían en cuanto a su temperatura de incubación. El primer paso consiste en la desnaturalización del ADN nativo de doble hebra por calentamiento a temperatura elevada, proporcionando hebras sencillas. En el segundo paso, a menor temperatura se alinean los primers con sus secuencias complementarias del ADN diana. En el tercer paso se realiza la síntesis de una segunda hebra complementaria de ADN nuevo, que se produce al extenderse el primer utilizando la ADN Taq polimerasa, copiando la secuencia del ADN molde adyacente. Tras la extensión de los primers, el ciclo se repite, aumentando primero la temperatura, de modo que todo el ADN de doble hebra se convierta en ADN de cadena sencilla y de esta manera las hebras de ADN sintetizadas de nuevo son molde de las siguientes (González y Medina 2001).

El número de ciclos de amplificación para producir una banda visible en un gel de agarosa depende del número de copias de ADN molde y la eficiencia de los primers. El límite de la reacción ocurre generalmente después de los 30 ciclos con una concentración de 105 copias del ADN molde y una eficiencia de la ADN polimerasa del 70%. Los fragmentos generados son separados por electroforesis y así se detectan los diferentes patrones de bandas característicos de cada marcador molecular (Swati, Prabhakar, Ranjekar, & Vidya, 1999).

1.4.3.4 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares basados en el ADN han actuado como herramientas en estudios de taxonomía, fisiología, embriología, ingeniería genética, genética poblacional, mapeo, genotipos, entre otros.

Una manera de evaluar la variación genética en una población consiste en examinar el polimorfismo genético, que es la presencia en una población de dos o más alelos para un locus dado, aunque muchos de los alelos están presentes en baja frecuencia (Lewin, 2001). Los marcadores moleculares identifican polimorfismos presentes en el genoma de las especies. Las propiedades deseables para los marcadores de ADN se basan en: una alta naturaleza polimórfica, codominancia, frecuente ocurrencia en el genoma, carácter neutral selectivo, fácil acceso, rápidos y con alta reproducibilidad. Es difícil encontrar un marcador molecular que reúna todas estas condiciones, pero dependiendo del tipo de estudio el marcador es seleccionado de acuerdo a las características que proporciona (Lewin, 2001; Swati *et al.*, 1999).

Varios tipos de marcadores moleculares han sido utilizados para evaluar los polimorfismos de ADN y se los clasifica como marcadores basados en hibridación y/o basados en la PCR. Los marcadores moleculares basados en hibridación consisten en la hibridación de sondas con secuencias específicas de ADN. En esta categoría de marcadores se encuentran los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y las repeticiones en tandem de número variable (VNTR). Mientras, que los marcadores moleculares basados en PCR consisten en la amplificación de productos de ADN. Dentro de este tipo de marcadores se encuentran los perfiles múltiples de amplicones arbitrarios (MAAP), polimorfismos de ADN amplificados al azar (RAPD), los polimorfismos de longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), repeticiones de secuencia simple (SSR), secuencias internas de repeticiones simples (ISSR), entre otros (Caetano & Gresshoff, 1998).

SSRs

Los marcadores moleculares SSRs también llamados microsatélites, son arreglos de repeticiones cortas organizados en tandem que comprenden unos pocos nucleótidos. Los marcadores SSRs son secuencias hipervariables distribuidas a través del genoma. Se estima que existe un total de 5×10^3 a 3×10^5 microsatélites en el genoma de las plantas (Condit & Hubbell, 1991). Estas regiones microsatélites pueden ser amplificadas mediante PCR (SSR-PCR) usando primers que las flanquean. En contraste al método

Las bandas generadas mediante ISSRs son similares a aquellos generados con técnicas como AFLPs (amplified fragment length polymorphisms) y RAPDs (randomly amplified polymorphic DNA). Los ISSRs tienen como ventaja ser más reproducibles que los RAPDs, debido a que su temperatura de alineamiento es más estable y alta (McCauley & Ballard, 2002). Además, el grado de polimorfismo revelado por los ISSRs es mayor que el detectado por los RAPDs (Cassasoli, Mattioni, Cherubini, & Villani, 2001; Nagaoka & Ogihara, 1997).

Los marcadores ISSRs son ampliamente usados en estudios de diversidad genética y estudios moleculares de ecología poblacional porque presentan las siguientes ventajas: son útiles para investigar poblaciones de la misma especie, tienen alta estabilidad, proveen abundante información genómica (Shen *et al.*, 2006), no se necesita información previa de las secuencias, tienen un bajo costo de desarrollo, los procedimientos de laboratorio son fácilmente transferibles entre especies de plantas (Hanfstingl *et al.*, 1994; Hardtke, Muller, & Berleth, 1996; Ullrich, LŠttig, Brennicke, & Knoop, 1997). Los ISSRs permiten observar un alto grado de variabilidad, lo cual es de gran valor en los análisis de variabilidad y relaciones entre organismos cercanamente relacionados. Los marcadores ISSRs han probado ser un método simple y eficiente, para generar en un corto tiempo, un gran número de marcadores moleculares adecuados para establecer mapas genéticos preliminares para especies previamente no estudiadas (Cassasoli *et al.*, 2001). El alto polimorfismo revelado por estos marcadores y la tendencia a distribuirse a través de los cromosomas, basada en la alta distribución de los marcadores SSR, son características interesantes de los marcadores ISSRs para propósitos de mapeo (Kojima, Nagaoka, Noda, & Ogihara, 1998). Además, las secuencias formadas por repeticiones en tandem tienen mayor probabilidad de presentar polimorfismos en ellas, esto ayuda en la cantidad de información que nos proveerán los ISSRs. (Barth, Melchinger & Lubberstedt, 2002).

1.4.3.5 Poder de resolución de un primer

El valor de un primer y su técnica estarán en función de cuantas bandas genera y que tan cerca de las condiciones óptimas está cada banda. Si todas las bandas fueran

óptimamente informativas, entonces el primer o la técnica más útil podría simplemente ser la que genera más bandas. Dado que las bandas pueden ser medidas de acuerdo a su similitud a la información óptima, la habilidad de un primer o una técnica para distinguir entre un gran número de genotipos puede ser la suma de estos valores ajustados. Esto puede ser descrito como el poder de resolución de un primer (R_p).

Para la mayoría de los sistemas moleculares de fingerprinting, la división de los genotipos en dos grupos es basada en la presencia o ausencia de una banda en una posición particular. Por lo tanto, idealmente una banda debería estar presente en la mitad de los genotipos y ausente de la otra mitad. Bajo condiciones óptimas de diagnóstico, el uso de la posición de una segunda banda puede dividir el taxón en cuartos. El sistema perfecto, por lo tanto, contendría un gran número de bandas, de las cuales cada una divide el taxón en mitades relativamente iguales. Entonces mientras mayor sea el número de posiciones de bandas consideradas, mayor es la probabilidad que dos de ellas dividan los genotipos en mitades complementarias (Prevost & Wilkinson, 1999).

1.4.4 Análisis de datos de marcadores dominantes

Para manejar los datos producto de la utilización de marcadores dominantes es necesario basarse en la metodología que considera únicamente la presencia o ausencia de bandas independientemente de si el individuo es homocigoto o heterocigoto. Los loci polimórficos de los marcadores dominantes son registrados para dos alelos, el alelo de presencia de banda y el alelo de ausencia de banda. Cada locus es así menos informativo que un típico locus microsatélite multialélico, es por esto que los marcadores dominantes es difícil distinguir los individuos heterocigotos de los homocigotos por el alelo de presencia de banda. Sin embargo, un gran número de marcadores ISSRs se encuentran en el genoma y su amplia distribución al azar da un balance a esta desventaja (Mariette, Chagne, & Lezier, 2001).

1.4.4.1 Coeficientes de similitud

Existen diferentes aproximaciones para analizar los perfiles individuales de los marcadores dominantes con datos binarios de presencia y ausencia de bandas. Uno de estos métodos se enfoca en el patrón de bandas su presencia o ausencia y se lo compara entre las muestras. Con este método se pueden utilizar varias métricas llamadas “coeficientes de similitud”, los que son vistos como medidas de distancias. Estos coeficientes pueden calcular para cada par de individuos en la población y luego promediar para dar una medida de la diversidad genética en la población (Bonin *et al.*, 2007).

Coeficiente de Jaccard

Toma en cuenta la presencia de bandas en al menos uno de los dos individuos, y por lo tanto no afecta la homoplasicidad de las bandas ausentes (cuando la ausencia de una banda es debida a diferentes mutaciones) (Jaccard, 1908).

Coeficiente de Dice

Es equivalente al coeficiente de Nei y Li y al de Sorensen. Comparado al coeficiente de Jaccard el coeficiente de Dice da mas peso a la presencia de bandas en ambos individuos. Por lo tanto pone su énfasis en la similitud entre individuos, más que en su disimilitud (Dice, 1945).

Coeficiente de simple agrupamiento

Este coeficiente maximiza la cantidad de información obtenida por los perfiles de los marcadores dominantes al considerar todos los loci registrados. La ausencia de una doble banda y la presencia de una doble banda dan la misma importancia biológica, lo cual no puede ser adecuado en el caso una frecuente ausencia de bandas por homoplasia. Este coeficiente tiene propiedades métricas euclidianas interesantes que permiten el uso de un análisis de varianza molecular (Bonin *et al.*, 2007).

Unas pocas reglas generales pueden ayudar a seleccionar las métricas más apropiadas en un caso específico. Incluso si con los coeficientes de similaridad se espera una alta correlación, esto no debe ser tomado como una garantía y debe ser cuidadosamente probado. Una pobre correlación puede por ejemplo deberse a una frecuente homoplasia de ausencia de bandas, y en ese caso en particular, se le da más crédito a los resultados basados en los coeficientes de Jaccard o Dice (Duarte, Santos, & Melo, 1999).

1.4.4.2 Agrupamientos y dendogramas

Agrupar es reconocer que los objetos son lo suficientemente similares para ser colocados en el mismo grupo y también identifica las distinciones o separaciones entre grupos. El agrupamiento es una operación de análisis multidimensional, el cual consiste en la división de los objetos del estudio. Para este análisis los objetos se dividen grupos y subgrupos, y cada objeto puede formar parte de un solo subgrupo en cada división. La clasificación de los objetos que resultan del agrupamiento puede incluir una simple división, o varias divisiones jerárquicas anidadas, dependiendo del modelo de agrupamiento seleccionado.

Los agrupamientos pueden ser representados en gráficos denominados dendogramas. Un dendograma es la representación más comúnmente usada de resultados de agrupamiento jerárquicos. Los dendogramas solo muestran la topología del agrupamiento y niveles de los objetos. Los dendogramas están hechos de ramas que se reúnen en nodos, los cuales son graficados en el valor de similaridad donde la fusión de las ramas toma lugar (Legendre & Legendre, 2000).

1.4.4.3 Diferenciación de poblaciones

Cuando una población se divide en subpoblaciones aisladas, hay menos heterogeneidad de la que habría en una población no dividida. Otros efectos que actúan en diferentes parches generalmente llevan a que las subpoblaciones posean frecuencias alélicas que son diferentes de poblaciones grandes. La frecuencia de alelos en cada

generación representa a una muestra de la frecuencia alélica de la generación previa. Y si estos parches son más pequeños en tamaño que las poblaciones grandes, entonces habrá un mayor error en los pequeños grupos del que habría en poblaciones grandes y no diferenciadas. Así, la deriva génica empujará a estos pequeños parches a través de diferentes frecuencias alélicas y la fijación de alelos será más rápida de la que toma lugar en grandes poblaciones no diferenciadas (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992).

1.4.4.4 F de Wright

El decline de la heterogocidad debido a la subdivisión dentro de una población usualmente a sido cuantificado utilizando un índice conocido como F estadística de Wright, también se lo conoce como índice de fijación. La F estadística es una medida de la diferencia entre la heterogocidad esperada, entre las subdivisiones en una población, y la frecuencia potencial de heterocigotos en todos los miembros de la población. El índice de fijación va de 0 (indicando que no hay diferencia entre el total de la población y sus subpoblaciones) a un máximo teórico de 1 (debido a que en la práctica el índice de fijación observado es mucho menor a uno incluso en poblaciones altamente diferentes). Los índices de fijación pueden ser determinados para diferentes niveles jerárquicos de la estructura de una población, para indicar por ejemplo, el grado de diferenciación dentro de una población entre grupos de parches (F_{sg}), dentro de grupos entre parches (F_{gt}) y dentro de una población entre parches (F_{st}). Para determinar el índice de fijación, la heterogocidad supuesta debe ser determinada a cada nivel. Para un locus con dos alelos alternativos, la frecuencia alélica se simboliza como p y la forma alternativa del alelo es igual a $1-p$, para una población subdividida en tres niveles jerárquicos (Excoffier *et al.*, 1992).

1.4.4.5 AMOVA

La F de Wright se basa en la comparación de la frecuencia de genes entre parches. Los datos moleculares no solo revelan la frecuencia de los marcadores moleculares, ellos también pueden decirnos algo acerca de la cantidad de diferencias en mutaciones entre diferentes genes. Una técnica que pueda ser usada para estimar la diferenciación

en una población y analizar diferencias entre secuencias moleculares en lugar de asumir frecuencia génicas mendelianas es muy útil (Excoffier *et al.*, 1992). El análisis de la varianza molecular (analysis of molecular variance [AMOVA]) es un método para estudiar la diferenciación en poblaciones directamente de datos moleculares y probando hipótesis acerca de esa diferenciación. Una variedad de datos moleculares, por ejemplo RFLP o AFLP, datos de secuencia directa o árboles filogenéticos basados en esos datos moleculares, pueden ser analizados usando este método. El AMOVA es equivalente a un ANOVA anidado. Un ANOVA anidado difiere de un ANOVA simple en que los datos están arreglados jerárquicamente y los cuadrados conocidos son calculados para grupos en todos los niveles jerárquicos. Esto permite probar hipótesis de diferencias entre grupos y dentro de grupos en muchos niveles jerárquicos (Legendre & Fortín, 1989).

1.4.4.6 Test de Mantel

El objetivo central en ecología es explicar la distribución de las especies en términos de presumibles variables ambientales que sean operativas en las especies. Este objetivo, por ejemplo, subraya mucho los análisis clásicos de gradiente, teoría de nicho y biogeografía. Pero este objetivo es confundido por dos problemas. Primero, las variables ambientales están intercorrelacionadas entre sí, y puede ser difícil atribuir a mecanismos casuales una variable, incluso si esta puede ser mostrada como correlacionada con la distribución de las especies. Segundo, las variables medio ambientales tienen una característica espacial ganada (autocorrelación), y su influencia puede ser expresada solo en escalas particulares de referencia. En los análisis estadísticos convencionales, el problema original es dirigido vía métodos multivariable que permiten tomar en cuenta las correlaciones entre las variables predichas; la regresión parcial es una solución familiar a este problema (Legendre & Fortín, 1989).

El test de Mantel es una aproximación que supera algunos de los problemas inherentes en la explicación de las relaciones especies-medioambiente. El test de Mantel es una regresión en la cual las variables son, en sí mismas, matrices de distancia o disimilitud que resumen los apareamientos de similaridad entre las situaciones de las

muestras. Un caso importante que el test de Mantel considera explícitamente es donde la variable predicha es espacio, medido como distancia geográfica. De hecho, el poder y versatilidad de este test proviene de las diferentes formas en que las matrices de distancia o regresión pueden ser armadas. Por ello, existen varios casos para el test de Mantel (Legendre & Legendre, 2000; Mantel, 1967) y uno de ellos se encuentra detallado a continuación.

Test de Mantel simple con distancias geográficas

Si la matriz de distancias dependiente es la similaridad de las especies y la matriz predicha es de distancias geográficas (disimilaridad espacial), entonces se realiza un simple test de correlación entre las dos matrices. Esa correlación puede indicar que las situaciones que son similares ambientalmente tienden a ser similares en su composición (Mantel, 1967).

1. 5 Sistema de hipótesis

- *Polylepis incana* presenta una alta diversidad genética en relación a *Polylepis pauta*.
- Las poblaciones más aisladas de *Polylepis incana* y *Polylepis pauta* presentan menor diversidad genética que las menos aisladas.
- La diversidad genética entre poblaciones es mayor que dentro de las poblaciones.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La presente investigación la realizó la señorita Andrea Valeria Ochoa Tufiño en los laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología del departamento de Ciencias de la Vida de la Escuela Politécnica del Ejército.

Los colaboradores científicos del proyecto en la Escuela Politécnica del Ejército fueron la Dra. Karina Proaño y la Dra. Patricia Jiménez, quienes desempeñaron las funciones de directora y co-directora respectivamente. Además, la M.Sc. Claudia Segovia investigadora asociada con la Universidad de Florida apoyó en la investigación proporcionando asesoría técnica.

2.2 Zona de Estudio

Los bosques de *Polylepis* cuyas poblaciones fueron analizadas se localizan en el páramo de Papallacta provincia de Pichincha y en el páramo de los Ilinizas provincia de Cotopaxi.

El estudio fue ejecutado en las instalaciones de la Escuela Politécnica del Ejército, a través de los Laboratorios de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología, ubicados en el campus Politécnico Sangolquí, cantón Rumiñahui, provincia de Pichincha.

2.3 Período de tiempo de investigación

La presente investigación fue iniciada en el mes de enero del año 2007 y culminada en el mes de Julio del 2008.

2.4 Diseño

Se realizó un análisis exploratorio con las variables detalladas en la tabla 2.1, para describir las características globales del conjunto de datos y detectar los patrones de regularidad espacial. Por medio de un conjunto de herramientas estadísticas que permiten describir la estructura de los datos desde una perspectiva univariada, bivariada y espacial (Miranda y Condal, 2003).

Tabla 2.1 Variables analizadas en el estudio de genética poblacional de *P. pauta* y *P. incana*

Variables independientes	Variables dependientes
Primer	Grupo de clasificación
Banda de ISSR amplificada	
Especie de <i>Polylepis</i>	
Localización del bosque	

2.5 Procedimientos

2.5.1 Recolección de muestras

Se analizaron varias poblaciones de los bosques de *Polylepis*, en cada población (1 población en los Ilinizas y 2 poblaciones en Papallacta) se seleccionaron diez plantas (McCaulley & Ballard, 2002). Las plantas para el muestreo fueron escogidas al azar en toda la población la población, variando en su tamaño y nivel de madurez (tabla 2.2).

En el campo se realizó una codificación de los individuos, para su posterior identificación, tomando en cuenta la localización donde se los recolectó (tabla 2.2). Cada muestra consistió en aproximadamente 10 folíolos pertenecientes a hojas jóvenes. Las hojas fueron colocadas en tubos de 2 ml con sílica gel, se utilizaron dos tubos por árbol. En el laboratorio as muestras se almacenaron a -80°C (Schmidt *et al.*, 2006) hasta su posterior uso.

Inicialmente, se colectaron sesenta individuos para este estudio, sin embargo, por problemas con el congelador de -80°C la mitad de las muestras se degradaron, lo cual no permitió analizar todo el material recolectado.

Tabla 2.2 Muestras recolectadas para el estudio con sus detalles de codificación, especie, parche correspondiente, puntos de localización global y altura.

Código	Especie	Páramo	Parche	Puntos GPS	Altura [msnm]
2P1	<i>P. incana</i>	Papallacta	P1	S 00°03.795` ; W 078°15.036`	3518
4P1					
8P1					
12P1					
14P1					
1P2	<i>P. incana</i>	Papallacta	P2	S 00°18.263` ; W 078°14.206`	3685
7P2					
9P2					
10P2					
15P2					
1P3	<i>P. pauta</i>	Papallacta	P3	S 00°20.200` ; W 078°13.154`	4026
6P3					
12P3					
4P4					
6P4					
10P4	<i>P. pauta</i>	Papallacta	P4	S 00°20.377` ; W 078°12.797`	4000
14P4					
2P5					
11P5					
13P5					
1I	<i>P. incana</i>	Ilinizas	I	S 00°36.000` ; W 078°31.00`	4094
2I					
3I					
5I					
7I					
9I					
11I					
12I					
13I					
15I					

Los bosques de *Polylepis* cuyas poblaciones fueron analizadas se localizan en el páramo de Papallacta (cordillera oriental) provincia de Pichincha y en el páramo de los Ilinizas provincia de Cotopaxi (cordillera occidental) (Figura 2.1).

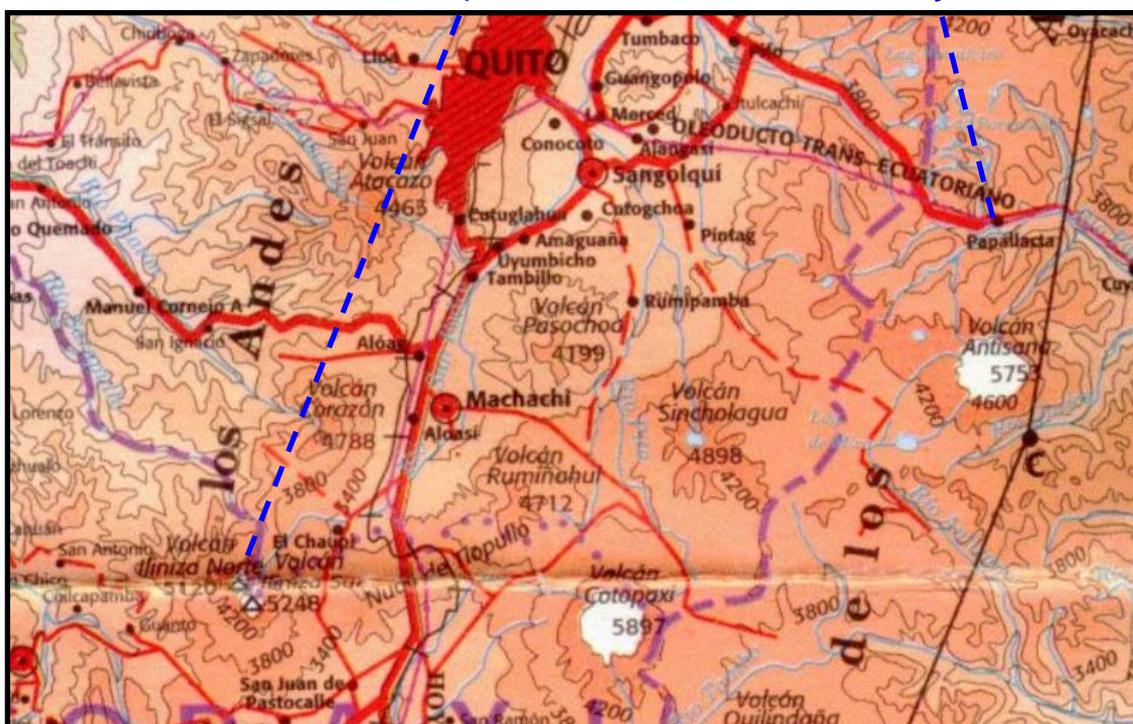
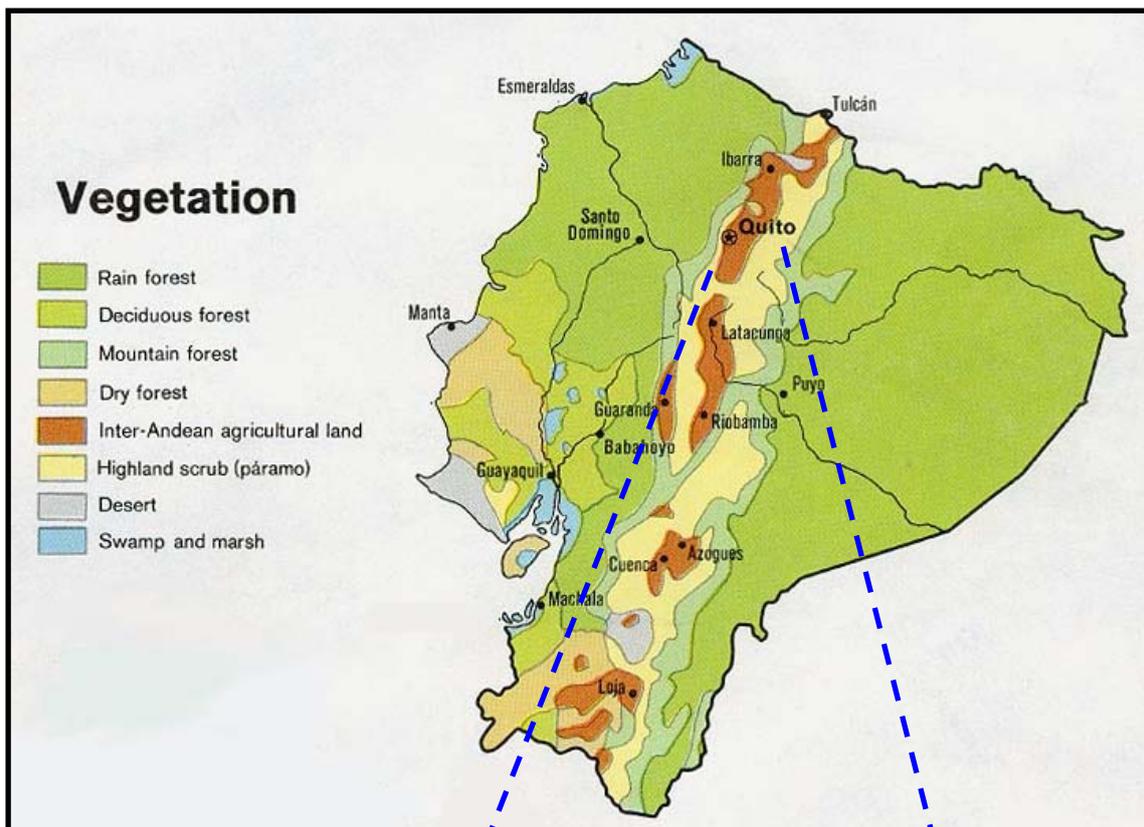


Figura 2.1 Mapa del Ecuador donde se encuentran señalados los páramos de Papallacta y los Ilinizas, localizaciones en las cuales se recolectaron las muestras para este estudio.

2.5.2 Extracción de ADN

Para seleccionar el mejor método extracción de ADN se realizó una búsqueda bibliográfica de protocolos usados en plantas leñosas que contienen altas concentraciones de metabolitos secundarios. A continuación se detallan los cuatro protocolos analizados en función del que obtenga la mayor cantidad y calidad de ADN.

2.5.2.1 Protocolo de extracción de ADN de Edwards (1991)

Este protocolo sirve para extraer ADN a partir de material seco. El material vegetal (200 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 600 ul de buffer de extracción (Tris HCl 200 mM pH 7,5; NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, 0,5% SDS). La muestra se continuó macerando en el mismo mortero, luego se transfirió el material a un tubo de 1,5 ml.

A continuación el tubo se centrifugó a 5000 rpm por 4 minutos a 4°C. El sobrenadante fue trasladado a un tubo nuevo, al cual se añadió un volumen de alcohol isoamílico frío. Se mezcló lentamente por inversión y se dejó reposar por 30 minutos a -20°C. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y se secó durante 20 minutos. Para luego resuspenderlo en 100 ul de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM) y almacenarlo a -20°C.

2.5.2.2 Protocolo de extracción de ADN de Doyle & Doyle (1987)

Este protocolo es un procedimiento rápido para aislamiento de ADN de pequeñas cantidades de tejido de hojas fresco. El material vegetal (25 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 500ul de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8; CTAB 0,4%, 2b-mercaptoetanol 0,2% a 65°C) para macerar la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se trasladó la mezcla a tubos de 1,5 ml para ser incubada en baño maría a 65°C por 1 hora, con agitación cada 20 minutos.

Terminada la lisis los tubos se enfriaron por 5 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo alcohol isoamílico CIA (24:1), luego se mezcló el tubo suavemente por inversión y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo estéril y se repitió la limpieza con CIA. Posteriormente el ADN fue precipitado con las dos terceras partes de alcohol isopropílico frío.

Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se descartado y el pellet fue lavado con 1ml de etanol frío al 70% durante 5 minutos. Se secó durante 20 minutos y se resuspendió en agua ultra pura a 4°C durante toda la noche. Las muestras fueron luego almacenadas a -20°C.

2.5.2.3 Protocolo de extracción de ADN de Khanuja, Shasany, Darokar & Kumar (1999)

Este es un protocolo diseñado para el aislamiento rápido de ADN de muestras frescas o secas de plantas que producen grandes cantidades de metabolitos secundarios y aceites esenciales. El material vegetal (500 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. El material se transfirió a un tubo de 10 ml de polipropileno. Se añadió 3ml de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8; NaCl 5 M, EDTA 25 mM pH 8; CTAB 2,5%; PVP 1%; 2b-mercaptoetanol 0,2%). El contenido del tubo se mezcló por inversión. Posteriormente, la muestra fue incubada en baño maría con agitación, a 60°C por 1 o 2 horas.

Terminada la lisis se añadió 3ml de cloroformo: alcohol isoamílico CIA (24:1), se mezcló por inversión durante 15 minutos y se centrifugó a 8000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo de 10ml estéril y se añadió 1,5ml de NaCl 5M y 0,6 volúmenes de isopropanol. Se mezcló por inversión y se dejó reposar por 1 hora a temperatura ambiente.

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con de etanol al 80%. Se secó durante 20 minutos y se resuspendió en 500 ul de TE alto en sales (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 1 M). Luego, se añadió 5 ul de RNasa (10 mg/ul) y se incubó en baño maría durante 30 minutos a 37°C, al término del mismo se añadió 300 ul de CIA 24:1 y se mezcló el tubo por inversión. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante pasó a un tubo estéril, al cual se añadió 300 ul de etanol frío. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, el pellet fue lavado con etanol al 80% y secado por 20 minutos. Al final el pellet fue resuspendido en 200 ul de agua bidestilada.

2.5.2.4 Protocolo de extracción de ADN de Porebski, Bayley, & Brown (1997)

Es un protocolo de extracción de ADN con CTAB, para plantas que contienen una gran cantidad de componentes polisacáridos y polifenoles. El material vegetal (500 mg de tejido seco) fue triturado en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido y macerado con 5 mg de PVP hasta tener un fino polvo. Se añadió 500 ul de buffer de extracción (Tris HCl 100 mM pH 8; NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8; CTAB 0,2%; 2-mercaptoetanol 0,3% a 65°C) para macerar la muestra en el mismo mortero. Posteriormente se trasladó la mezcla a tubos de 1,5 ml estériles para ser incubada en baño maría a 65°C por 1 hora, con agitación cada 20 minutos.

Terminada la lisis se dejó enfriar cada tubo por 5 minutos. Se añadió un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por 5 minutos y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue trasladado a un nuevo tubo de 1,5 ml y se repitió la purificación por CIA hasta no tener interfase después de la centrifugación. Se añadió mitad del volumen de NaCl 5 M y 2 volúmenes de etanol frío al 95%. Las muestras fueron centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet fue lavado con etanol frío al 70%. Se secó durante 20 minutos y se resuspendió en TE a 4°C durante toda la noche. Se añadió 3 ul de RNasa (10 mg/ul). Las muestras fueron incubadas en baño maría durante 1 hora a 37°C, al término del mismo se añadió 3 ul de proteinasa K y se incubó a 37 °C por 30 minutos más.

Posteriormente se colocó 1 volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) y se centrifugó a 10000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se lo pasó a un tubo estéril y se añadió la décima parte del volumen con acetato de sodio 2 M. Se dejó en reposo toda la noche a -80°C. Se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, el pellet fue lavado con etanol frío al 70% y fue resuspendido con 200–300 ul de TE. Se almacenó a -20°C.

2.5.3 Preparación de geles de agarosa

La agarosa en polvo se mezcla con TBE 1X mediante agitación magnética por cinco minutos, para permitir que el polímero se hidrate. Esta mezcla se calentó varias veces en el microondas hasta que tome una apariencia totalmente traslúcida. Cuando la temperatura de la preparación esta alrededor de los 50°C se colocó el bromuro de etidio (5 ul/100 ml). Luego, se vertió la mezcla en una cubeta y se esperó que se enfríe para que se forme el gel.

2.5.4 Cuantificación de DNA

Para cuantificar el ADN, poder conocer su pureza y grado de degradación, se usó geles de agarosa al 1% (p/v). En cada posillo se cargó 8 ul de ADN con 2 ul de loading buffer Blue Juice 5X INVITROGEN®. Además, se cargó 5 ul de un marcador molecular de 1Kb DNA Ladder INVITROGEN® y 5 ul del marcador de peso molecular High DNA Mass Ladder INVITROGEN®. Se usó el marcador de 1 Kb para verificar que la muestra es ADN genómico vegetal y el marcador High DNA Mass Ladder para cuantificar el ADN mediante la comparación de la intensidad de las bandas.

La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300 mA durante una hora. La posterior visualización de las bandas y almacenamiento de la información se realizó en un fotodocumentador BioDoc-IT System.

2.5.5 Amplificación de secuencias mediante ISSRs

Para la amplificación de las secuencias que muestren polimorfismos mediante marcadores tipo ISSRs se analizó algunas condiciones utilizadas en estudios en los que se trabajó con: especialización de híbridos diploides en *Penstemon* (Scrophulariaceae) (Wolfe, Xiang, Kephart, 1998), marcadores moleculares de huellas digitales ISSRs para autenticar poblaciones de *Dendrobium officinale Kimura y Migo* (Shen *et al.*, 2006), afinidades de nacimiento y bigeográficas de poblaciones centrales y marginales de *Froelichia Floridana* (Amaranthaceae) de marcadores ISSRs (McCauley & Ballard, 2002), un nuevo sistema de comparación de primers de PCR aplicando huellas digitales mediante ISSRs en variedades de papa (Prevost & Wilkinson, 1999) y un mapa de relación de *Castanea sativa Mill* basada en RAPD, ISSR y marcadores de isozimas (Casasoli *et al.*, 2001)

Los estudios mencionados permitieron seleccionar 10 primers generales para plantas que han presentado buenos resultados a nivel de polimorfismos (McCauley & Ballard, 2002), los cuales se detallan en la tabla 2.3. Posteriormente, se analizaron las características de los protocolos usados en estos estudios y se estableció un protocolo base para los marcadores ISSRs.

Tabla 2.3 Lista de los diez primers usados en el estudio con sus respectivas secuencias

PRIMER	SECUENCIA 5'a 3`
844A	(DNA)- ctctctctctctctac
844B	(DNA)- ctctctctctctctgc
17898A	(DNA)- cacacacacacaac
17898B	(DNA)- cacacacacacagt
17899A	(DNA)- cacacacacacaag
17899B	(DNA)- cacacacacacagg
HB9	(DNA)- gtgtgtgtgtgtgg
HB11	(DNA)- gtgtgtgtgtgtcc
HB12	(DNA)- caccaccagc
HB14	(DNA)- ctctctctctgc

Las condiciones de temperatura, seleccionadas a partir de estudios con ISSRs (Tabla 2.4), se mantuvieron constantes para todos los primers a excepción de la temperatura de alineamiento.

Tabla 2.4 Condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación de secuencias ISSRs.

Fases		Temperatura [°C]	Tiempo [m]
Denaturación inicial		94	2
40 ciclos	Denaturación	94	0,5
	Alineamiento	*	0,75
	Extención	72	2
Extención final		72	7

*Condición dependiente del primer

La temperatura de alineamiento es propia de cada primer y depende del número y tipo de bases nitrogenadas de las cuales está formado. Por tanto, se calculó la temperatura de alineamiento, para cada primer, en base en la siguiente fórmula:

$$T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$$

$$T_a = T_m - 4$$

Con esta fórmula se obtuvo las temperaturas de meeting y alineamiento teóricas (Tabla 2.5) de los 10 primers del estudio. A partir de estas temperaturas se realizó ensayos, en los cuales inicialmente se probó tres temperaturas de alineamiento con una variación de 3°C entre cada una de ellas. Posteriormente, se analizó el rango, en el cual los productos amplificados tenían mejor calidad. En base al rango seleccionado anteriormente se realizó un segundo ensayo, donde se probó tres temperaturas con la variación de un grado entre ellas. En todos los ensayos se usó un individuo de *P. pautia* y un individuo de *P. incana*, cada uno de ellos con dos repeticiones además, en cada ensayo se incluyó un control negativo (sin ADN). Los ensayos se realizaron independientemente para cada uno de los 10 primers.

Tabla 2.5 Temperatura de melting calculada y temperaturas de alineamiento ensayadas para cada uno de los 10 primers.

Primer	Tm calculadas [°C]	Ta del primer ensayo [°C]	Ta del segundo ensayo [°C]
17898A	42	38, 41, 44	45, 46, 47
17898B	42	38, 41, 44	41, 42, 43
17899A	42	38, 41, 44	43, 44, 45
17899B	44	40, 43, 46	42, 43, 44
HB9	44	40, 43, 46	43, 44, 45
HB11	44	40, 43, 46	45, 46, 47
HB12	38	33, 37, 40	39, 40, 41
HB14	38	33, 37, 40	39, 40, 41
844A	54	50, 53, 56	52, 53, 54
844B	56	52, 55, 58	52, 53, 54

En base a estas temperaturas se elaboró un programa base para las amplificaciones, las cuales se realizaron en el termociclador Techne-TC-512.

Las concentraciones de los reactivos (Tabla 2.6) permanecieron constantes a excepción del MgCl₂. La concentración del MgCl₂ se estandarizó para los 10 primers probándose las concentraciones de 1,5 mM, 1,8mM y 2,0 mM. En todas las pruebas se usó un individuo de *P. pauta* y un individuo de *P. incana*, cada uno de ellos con dos repeticiones además, en cada ensayo se incluyó un control negativo (sin ADN). La solución madre para todas las reacciones se llevó a cabo con reactivos INVITROGEN® y su ensamblaje se realizó en una cámara de bioseguridad tipo II CSB 120.

Con las condiciones ya estandarizadas se realizó la amplificación de las secuencias ISSRs, de los 10 primers, en los treinta individuos objeto del estudio. En todos los ensayos se realizaron dupletas de cada individuo y se incluyó un control negativo (sin ADN). Por tanto, para el análisis de todos los individuos fueron necesarias aproximadamente 700 reacciones PCR, independientemente de las reacciones que necesarias para la estandarización de las condiciones de amplificación.

Tabla 2.6 Concentraciones de los reactivos para la amplificación de ISSRs. Se estandarizaron las concentraciones específicas para cada primer.

Reactivo	[C inicial]	[C final]	V final (ul)
Buffer	10 X	1 X	2,50
MgCl₂	50 mM	2 mM	1
dNTPs	10 mM	0,8 mM	2
Primer	100 pmol/ul	0,25 pmol	0,25
Taq polimerasa	5 U/ul	1 U	0,2
H₂O	-	-	17,05
ADN	20 ng/ul	-	2
TOTAL			25

2.5.6 Visualización de productos amplificados

El análisis de los productos amplificados se lo realizó en geles de agarosa al 1,5% (Shen *et al.*, 2006). Para conocer el tamaño de cada una de las bandas amplificadas, en el último pocillo del gel se colocó 5 ul del marcador molecular 100 bp DNA Ladder INVITROGEN®.

La corrida electroforética se fijó en 120 V y 300 mA durante dos horas y veinte minutos aproximadamente (hasta que la fracción amarilla del marcador molecular llegue al extremo inferior del gel). La posterior visualización de las bandas y almacenamiento de la información se realizó en un fotodocumentador BioDoc-IT System.

2.5.7 Registro de datos

Los datos fueron registrados tomando en cuenta la presencia o ausencia de bandas (McCauley & Ballard, 2002). Las bandas fueron marcadas como presentes solo si se presentaron en ambas réplicas. Se realizó una matriz con los datos en código binarios siendo la presencia igual a 1 y la ausencia igual a 0 (Shen *et al.*, 2006). Esta matriz tiene la estructura adecuada para ser sometida a diversos programas bioestadísticos para el análisis de genética poblacional.

2.6 Análisis de datos

2.6.1 Genética poblacional

Los marcadores dominantes ISSRs, presentan ciertas limitaciones en el momento de realizar los análisis de genética poblacional. Primero, el equilibrio de Hardy-Weinberg no puede ser medido directamente y puede fácilmente ser alterado en los loci de ISSRs. Segundo, se debe considerar que el compartir la ausencia de bandas no siempre indican un genotipo homocigoto recesivo. Sin embargo, hay métodos que evitan el cálculo de la frecuencia alélica (Culley *et al.*, 2007).

Para evitar los problemas asociados con el análisis de datos de marcadores dominantes, se usarán solo los datos de presencia y ausencia de bandas, sin tomar en cuenta el equilibrio de Hardy-Weinberg. (Culley *et al.*, 2007).

2.6.1.1 Cálculo de distancias genéticas

El método de los coeficientes de similitud en el emparejamiento de bandas incorpora sólo bandas que están presentes usando coeficientes como Jaccard (1908) y Nei & Li (1979), Dice (1945) y Sorensen (1948), los cuales comparan las bandas compartidas entre individuos o poblaciones. La utilización de los coeficientes de similaridad es ventajosa porque la ausencia de bandas puede ser excluida del análisis y no se asume el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La distancia genética se cuantificó usando el coeficiente de Dice para comparar el número de alelos compartidos entre individuos o poblaciones, excluyendo las bandas ausentes compartidas. El coeficiente de similaridad se calculó para cada población, a partir de la matriz binaria, directamente en el programa NTSYSpc versión 2.11a (Rohlf, 1998), con la opción SimQual (Figura 2.1) que permite cálculos de similaridad con datos cualitativos. NTSYS genera una matriz cuadrática de similaridad, a partir de la cual, se elaboró en EXCEL una matriz de contingencia triangular. Con los datos previos

se elaboró una matriz de disimilaridades, donde la disimilaridad se la puede expresar como 1-similaridad. Los valores de disimilaridad están en el rango desde 0 (no hay diferencia entre los grupos) a 1 (diferencia completa entre los grupos) (McCauley & Ballard, 2002). Tanto la similaridad como disimilaridad son medidas de distancia.

Se realizó además, un análisis de concordancia de los resultados entre cada par de individuos mediante el índice Kappa en el programa SPSS versión 2.0 (Norusis, 1998). Este índice nos muestra con valores de 1 total concordancia y con valores negativos la discordancia entre los resultados de cada pareja. El programa SPSS generó los resultados en una tabla, cuya interpretación presentó ciertas complicaciones, por lo que se elaboró en EXCEL una matriz de contingencia triangular, la cual permite interpretar fácilmente los resultados.

2.6.1.2 Análisis de la diferenciación genética

El análisis de la varianza molecular (AMOVA) admite los datos generados por marcadores ISSRs. Este método parte de observar la variación dentro y entre los componentes de una población usando distancias genéticas (Culley *et al.*, 2007).

La diferenciación genética se examinó con un análisis jerárquico de varianza molecular AMOVA usando Arlequín versión 3.1 (Excoffier, Laval & Schneider, 1996). Este método trata a los datos dominantes como haplotipos y analiza el total de la varianza en los componentes de la covarianza asociados con diferencias entre individuos dentro de poblaciones, entre individuos en diferentes poblaciones dentro de grupos y entre grupos (Culley *et al.*, 2007).

Para el análisis el programa calcula las distancias euclidianas entre pares de vectores, entonces la distancia euclidiana es simplemente una escala que es igual a la distancia menor entre dos puntos. El cuadrado de las distancias euclidianas se calcula para todos los pares de arreglos de vectores, los cuales son arreglos en una matriz dividida en

submatrices correspondientes a subdivisiones dentro de la población. Las subdivisiones están arregladas de tal manera que las submatrices en la diagonal de la matriz grande son pares de individuos en la misma población mientras que los que están fuera de la diagonal representan pares de individuos de diferentes poblaciones. La suma de las diagonales en la matriz y submatrices nos da la suma de cuadrados para varios niveles jerárquicos de la población. Estas sumas de cuadrados pueden ser entonces analizadas en un análisis anidado de estructura de varianza (Excoffier *et al.*, 1992).

2.6.1.3 Análisis de agrupamiento

Para inferir las relaciones biogeográficas entre poblaciones se usaron dos técnicas multivariable el análisis de agrupamiento UPGMA y el análisis del vecino más cercano neighbor joining (NJoin). El análisis UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic averages) también se llevó a cabo en NTSYS basado en la matriz de similaridad de Dice de la ocurrencia de fragmento en cada población, como una forma de resumir los datos para solo observar las relaciones entre poblaciones (McCauley & Ballard, 2002). A partir de la matriz generada mediante agrupamientos UPGMA se construyó un árbol de niveles de población. Igualmente con la matriz de similaridad de Dice se realizó el análisis del vecino más cercano, con cuyos datos se generó un árbol de relaciones entre individuos, llevándose a cabo en NTSYSpc versión 2.11a (Rohlf, 1998).

Se realizó además, un análisis de componentes principales (ACP), el cual permite observar la distribución de los individuos en las poblaciones y se basó en la matriz de código binario, este análisis se lo procesó en SPSS versión 2.0 (Norusis, 1998).

2.6.1.4 Relaciones biogeográficas

Para determinar si existe una relación entre las distancias geográficas y genéticas de las poblaciones, se realizó un test de Mantel. En este test se usó una matriz de distancias genéticas y una matriz de distancias geográficas con un set de 1000

permutaciones, mediante Arlequín versión 3.1 (Excoffier *et al.*, 1996). Para la elaboración de la matriz de distancias geográficas, las distancias fueron calculadas como distancias en línea recta entre los pares de lugares, usando la latitud y longitud de cada locación (Culley *et al.*, 2007). La significancia de Z fue determinada comparando el valor de Z observado con el valor crítico de Z obtenido de los sets permutados de datos (Barth *et al.*, 2002).

2.6.2 Análisis de primers

El valor de la posición de una banda en particular puede ser medido por su similitud a la condición óptima (50% de los genotipos contienen la banda). La información de la banda (Ib), puede ser representada en una escala de 0 a 1 con una simple fórmula:

$$Ib = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$$

Donde p es la proporción de genotipos que contienen la banda.

El valor Ib fue calculado par todas las 211 bandas informativas que fueron registradas en el estudio. Luego, al sumar los valores de Ib correspondientes a cada primer se puede conocer el poder de resolución de un primer (Rp) (Prevost & Wilkinson, 1999). Así mismo se calculó el número de bandas únicas y compartidas obteniéndose un el porcentaje de loci polimórficos (Pp) (Culley *et al.*, 2007).

Finalmente, se buscó conocer la relación de los primers con el resto de variables presentadas en el diseño experimental, mediante un análisis Factorial de Correspondencias Múltiples (AFCM), llevado a cabo en SPSS versión 2.0 (Norusis, 1998).

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Extracción y cuantificación de ADN

El resultado de las extracciones de ADN con los diferentes protocolos fue analizado mediante la intensidad de las bandas en el gel de agarosa. Las dos especies (*P. pauta* y *P. incana*), objeto del estudio, fueron usadas en las extracciones con cada uno de los protocolos.

La extracción de ADN con el protocolo de Doyle & Doyle (1987) presentó una banda de 12216 pb, con una concentración muy baja (Figura 3.1). Se observó además, en muchas de las muestras degradación del ADN y presencia de moléculas contaminantes. Inclusive en algunas muestras que no se obtuvo ADN se observaron moléculas contaminantes.

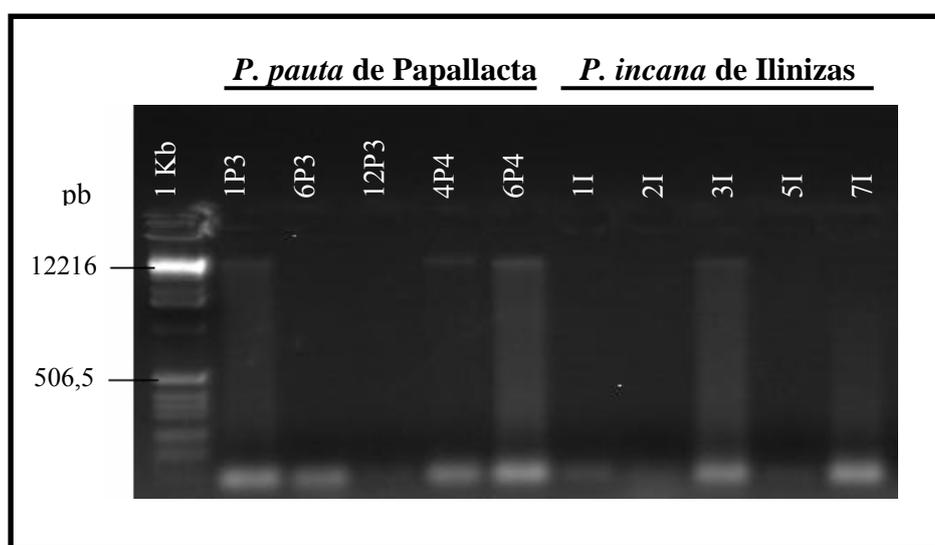


Figura 3.1 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Doyle & Doyle (1987). En el gel se encuentra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*.

Las muestras extraídas con el protocolo de Edwards *et al.* (1991) mostraron una banda localizada sobre los 12216 pb y se observó una baja concentración de ADN en cuatro de las diez muestras analizadas (13P5, 9I, 14I y 15I). Todas las muestras, incluyendo las que no mostraron una banda de ADN presentaron degradación de ADN, y

una gran cantidad de moléculas contaminantes de diversos tamaños (Figura 3.2).

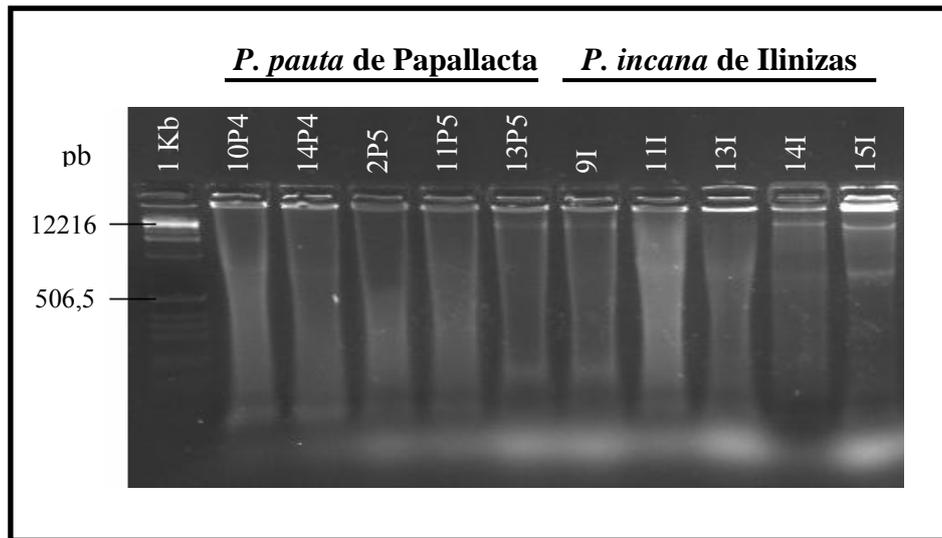


Figura 3.2 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Edwards (1991). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*

Las extracciones de ADN realizadas con el protocolo de Porebski *et al.* (1997) mostraron una banda de ADN muy bien definida sobre los 12216 pb. La concentración de ADN fue de aproximadamente 5 ng/ul. La degradación de las muestras fue muy baja y no se observó la presencia de moléculas contaminantes (Figura 3.3).

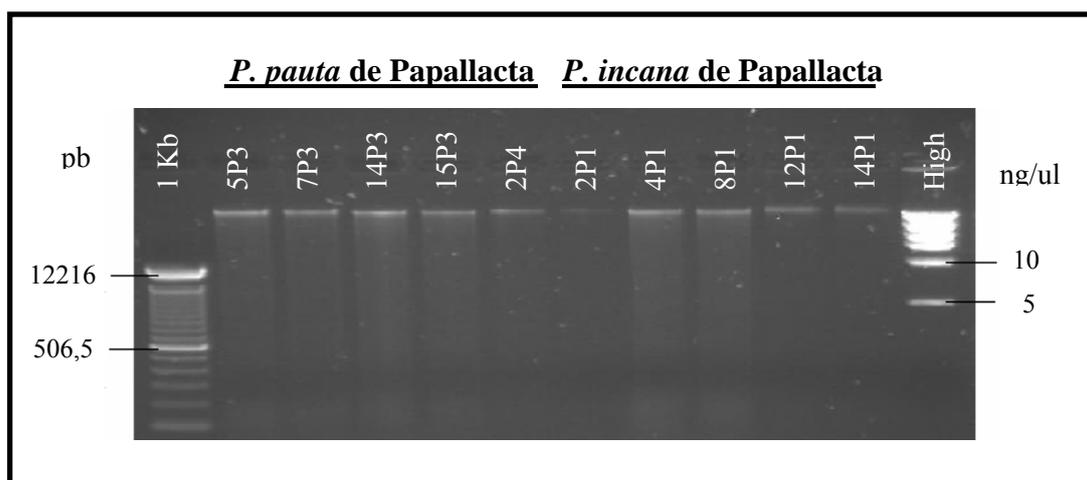


Figura 3.3 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN mediante el protocolo de Porebski *et al.* (1997). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN®, un marcador High Mass Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. pauta* y los otros cinco a *P. incana*.

En cambio, empleando el protocolo de Khanuja *et al.* (1999), se obtuvo una concentración de ADN de aproximadamente 20 ng/ul, (calculada en función de la intensidad de las bandas de ADN y el marcador High Mass Ladder (Figura 3.4)). En el gel se pudo evidenciar la ausencia de moléculas contaminantes y degradación no significativa del material genético. En función de mejorar los resultados del protocolo y en base a experiencias previas se lo modificó ligeramente en cuanto a los tiempos de centrifugación e incubación, concentración de proteinasa K y utilización de TE, en el anexo A se detalla el protocolo con sus modificaciones.

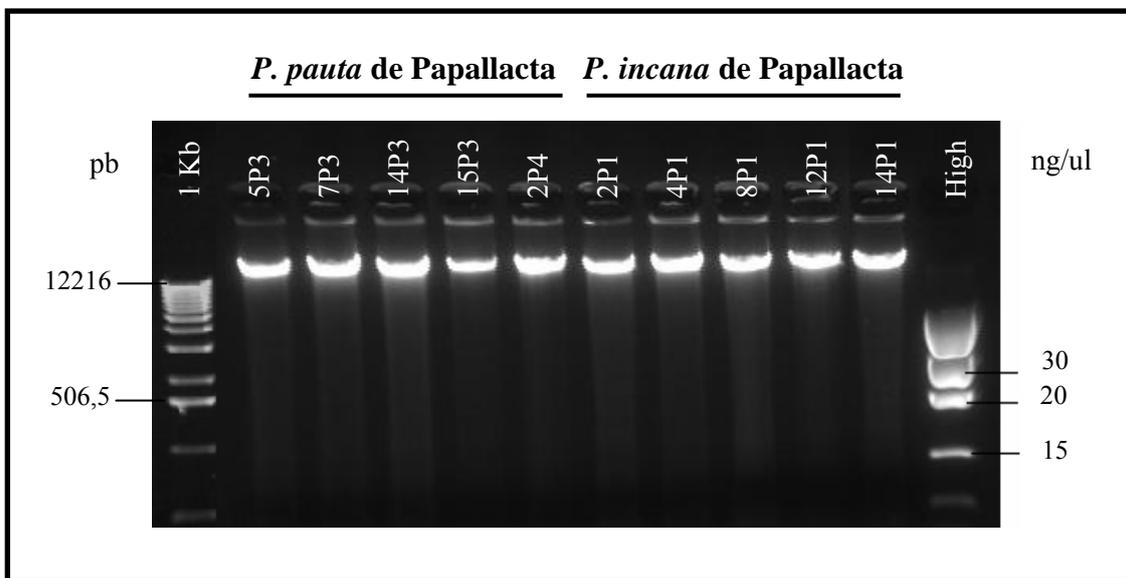


Figura 3.4 Electroforesis en gel al 1% del ensayo de extracciones de ADN con el protocolo de Porebski *et al.*, (1997). En el gel se muestra un marcador de 1 Kb DNA Ladder INVITROGEN®, un marcador High Mass Ladder INVITROGEN® y las extracciones de ADN de 10 individuos, los cinco primeros corresponden a *P. incana* y los otros cinco a *P. pauta*.

3.2 Estandarización de condiciones de temperatura y $MgCl_2$ para la amplificación de ISSRs

3.2.1 Estandarización de la temperatura alineamiento

Las condiciones de temperatura para la amplificación de los ISSRs se mantuvieron según el protocolo base elaborado al inicio del estudio (*Materiales y métodos*, ver Tabla

2.4). La temperatura de alineamiento para cada primer se modificó, debido a que está es una característica particular de la secuencia de cada uno de los 10 primers utilizados. La estandarización de la temperatura de alineamiento para cada uno de los primers, se la realizó variando la temperatura en un rango de seis grados centígrados hasta definir un rango de temperatura en el cual se obtuviera un patrón con el mayor número de bandas bien definidas (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Temperaturas de alineamiento (Ta) empleadas en los ensayos de estandarización y temperatura de alineamiento optimizada para los 10 primers del estudio.

Primer	Ta del primer ensayo [°C]	Ta del segundo ensayo [°C]	Ta estandarizada [°C]
17898A	38, 41, 44	45, 46, 47	47
17898B	38, 41, 44	41, 42, 43	42
17899A	38, 41, 44	43, 44, 45	43
17899B	40, 43, 46	42, 43, 44	43
HB9	40, 43, 46	43, 44, 45	44
HB11	40, 43, 46	45, 46, 47	45
HB12	33, 37, 40	39, 40, 41	40
HB14	33, 37, 40	39, 40, 41	40
844A	50, 53, 56	52, 53, 54	54
844B	52, 55, 58	52, 53, 54	54

En el caso del primer 17898B, por ejemplo se probaron tres temperaturas 38°C, 41°C y 44°C (Figura 3.5), de las cuales se pudo observar que a 38°C existe la presencia de siete bandas definidas entre los 400 y 1000 pb y bandas que no están claramente definidas entre los 600 y 400pb. A 41°C se observó que la definición de las siete bandas mejoró ligeramente, además de las tres bandas entre los 600 a 400pb. A 43°C se definen más algunas bandas pero otras desaparecen. Por lo tanto, se hicieron nuevos ensayos

con un rango menor de temperaturas entre los 41°C y 43°C, para definir la mejor temperatura de alineamiento que en este caso fue de 42°C.

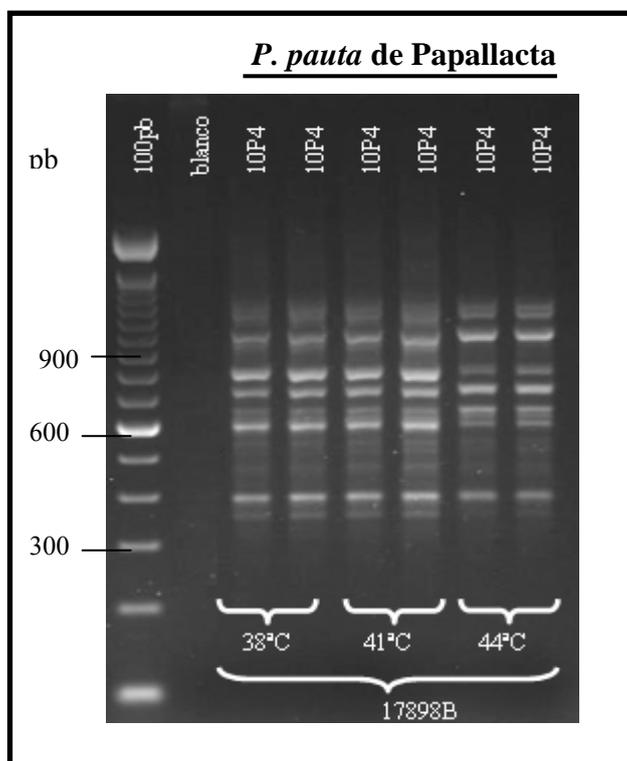


Figura 3.5 Electroforesis en gel al 1,5% del ensayo de pruebas de temperatura para el primer 17898B. Se utilizó un solo individuo, con dos repeticiones para cada temperatura y un marcador molecular de 100 pb DNA Ladder INVITROGEN®.

3.2.2 Estandarización del MgCl₂

En la estandarización del MgCl₂ se tomó el mismo criterio, del patrón de bandas, que se usó para seleccionar la temperatura óptima de alineamiento de los primers. Los diez primers se probaron inicialmente con la concentración de 2mM de MgCl₂, descrita en el protocolo base elaborado al inicio del estudio (*Materiales y métodos*, ver Tabla 2.6). Al probar la concentración de 2 mM de MgCl₂ se pudo observar que los patrones de bandas, de algunos primers, no presentaron una buena definición. Por lo que, se decidió probar con concentraciones menores de MgCl₂, en busca de una mejor definición de las bandas (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Concentraciones de MgCl₂ específicas por primer.

Primer	MgCl ₂ [mM]
17898A	1,8
17898B	2,0
17899A	2,0
17899B	1,8
HB9	1,8
HB11	1,8
HB12	2,0
HB14	2,0
844A	2,0
844B	2,0

En el caso del primer HB9 se probó concentraciones de 1,5 y 1,8 mM de MgCl₂ (Figura 3.6). Al utilizar la concentración de 1,5 mM de MgCl₂ se pudo observar 6 bandas en el individuo 14P4 y 5 bandas con el individuo 5P4. La concentración de 1,8 mM de MgCl₂ presentó un mayor número de bandas con cada individuo y estas tuvieron una intensidad mayor en comparación con las generadas con la concentración de 1,5 mM, por lo que se seleccionó la concentración de 1,5 mM de MgCl₂.

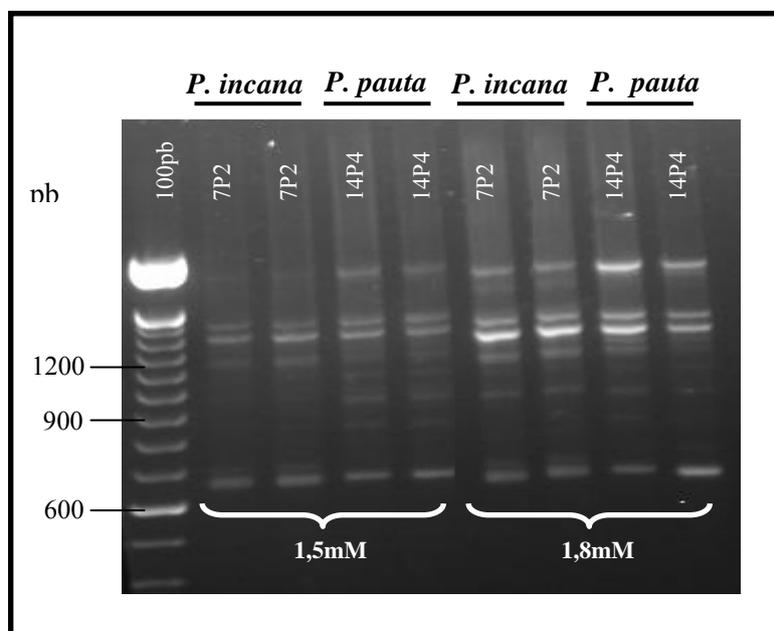


Figura 3.6 Electroforesis en gel al 1,5% de pruebas de concentración de MgCl₂ con el primer HB9. Se usaron dos accesiones con dos repeticiones de cada una con cada concentración y en el gel se colocó un marcador de 100pb DNA Ladder INVITROGEN®.

El resto de condiciones planteadas en el protocolo base (concentración de buffer, dNTPs, primer, Taq polimerasa, ADN) se mantuvieron constantes para todos los primers.

3.3 Amplificación del marcadores tipo ISSRs

Los 10 primers seleccionados y utilizados para la amplificación de los ISSRs (*Materiales y métodos*, ver Tabla 2.3). En los anexos B y C se puede observar dos patrones de bandas, de los múltiples patrones obtenidos en este trabajo, generados con el mismo primer en dos especies de *Polylepis*. Estos patrones fueron analizados visualmente en varias ocasiones independientes y compilados en una matriz de datos binarios (Anexo D). Es importante mencionar que los datos de las bandas no variaron entre las repeticiones de las accesiones o entre los geles para ninguno de los primers usados. La codificación de cada una de las bandas en la matriz binaria se facilitó por el uso del marcador de 100 bp en la corrida electroforética, ya que muestra un gran número de bandas útiles para comparar con las amplificaciones de los marcadores ISSRs usados (Figura 3.7).

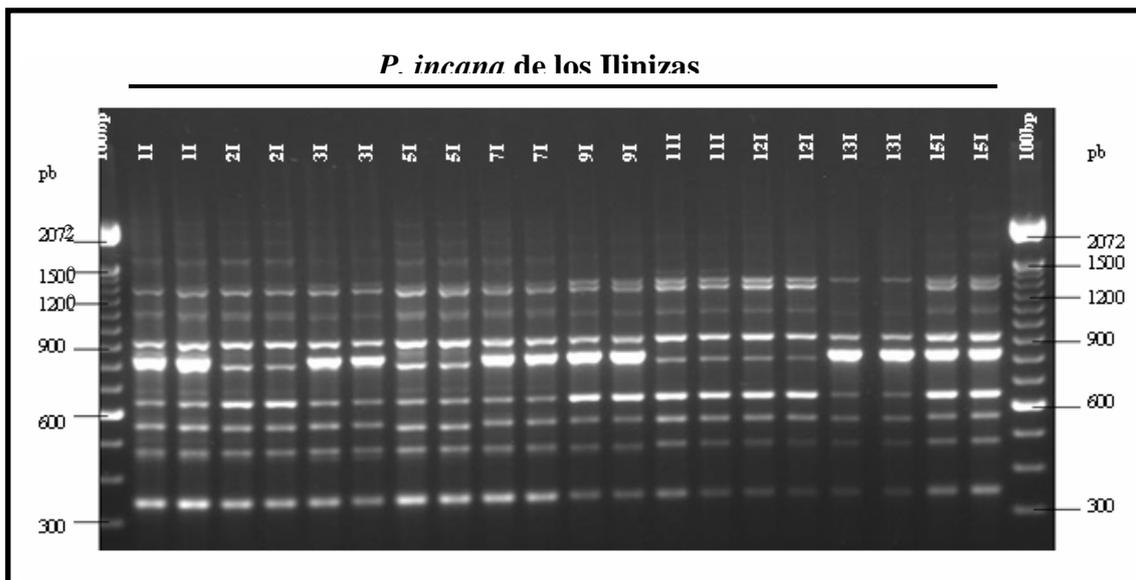


Figura 3.7 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB11 en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos.

En todas las amplificaciones realizadas con este marcador molecular se observó gran cantidad de bandas intensas y claramente definidas. Estas bandas se presentaron como patrón común en la mayoría de los individuos de las tres poblaciones (*P. pauta* de Papallacta, *P. incana* de Papallacta y *P. incana* de los Ilinizas).

Las bandas que se observaron con menor intensidad fueron las que presentaron mayor variación en cuanto a su presencia (no se observaron). Este tipo de variación fue notoria en dos o tres accesiones por población. La variación se presentó en los individuos, 2P1 y 4P1 de *P. incana* de Papallacta (Figura 3,8) y 11I, 12I y 13I de *P. incana* de los Ilinizas (Figura 3,9). Se repitió la amplificación con todos los individuos de la población, pero en pocas ocasiones variaron los resultados, lo cual indicó que las variaciones eran principalmente producto del material genético de la muestra y no de errores del operador.

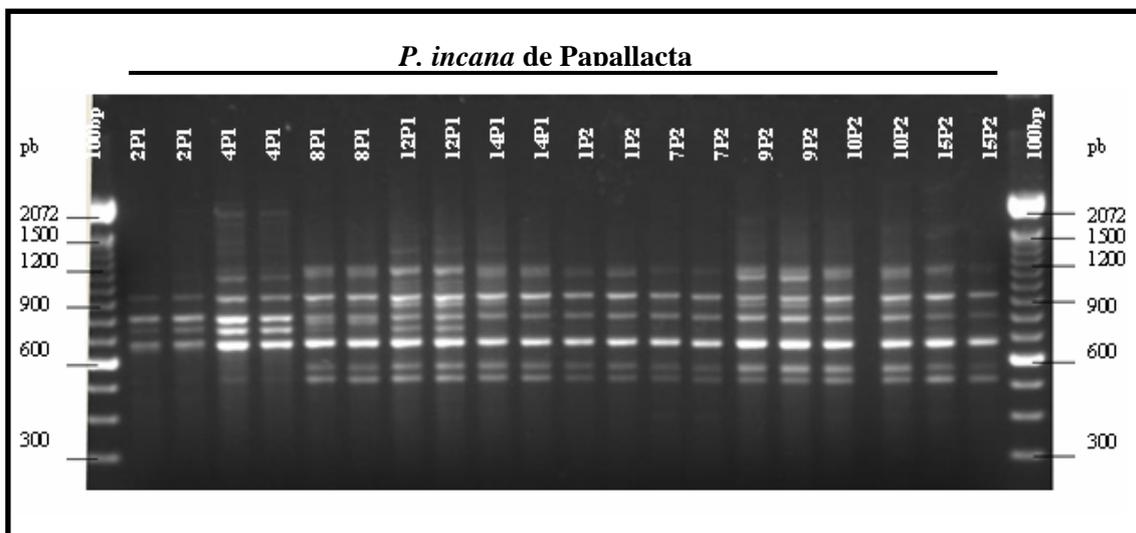


Figura 3.8 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB9 en la población de *P. incana* de Papallacta. En la accesión 2P1 se observa un menor número de amplicones y una baja intensidad de las bandas amplificadas en comparación con resto de accesiones. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos.

La variación descrita anteriormente ocurrió con algunos primers utilizados por población, el único primer que presentó esta disminución de bandas en los mismos 5 individuos (2P1, 4P1 y 11I, 12I y 13I), fue el HB14 (Figura 3.9). Lo cual, puede señalar que las muestras de estos ocho individuos poseían algún factor, a nivel de su material genético o de la solución en la que se encontraba el ADN, que influyó en la amplificación de las bandas menos intensas.

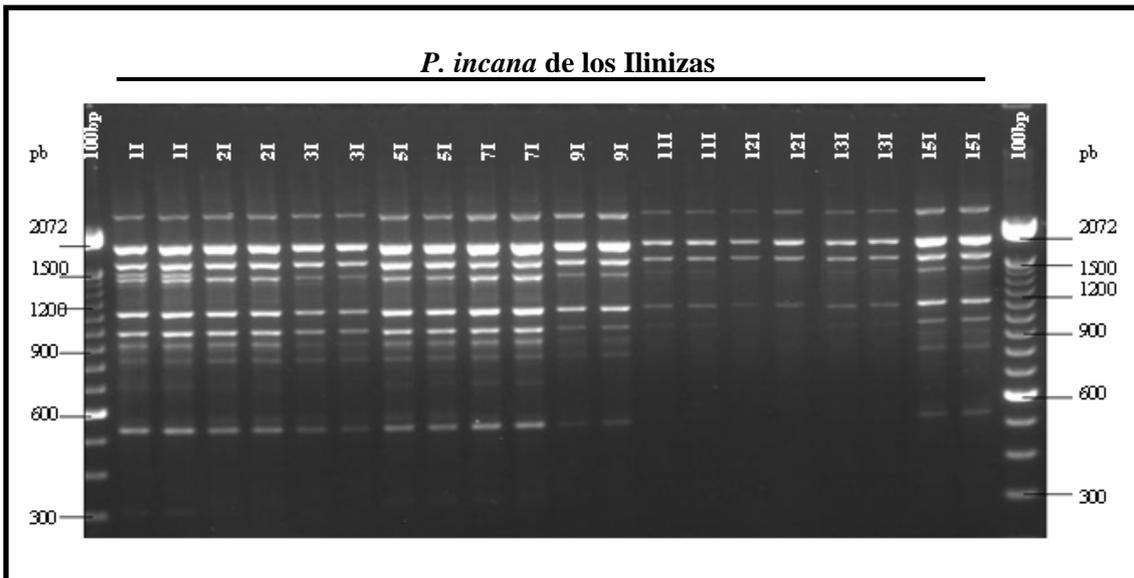


Figura 3.9 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer HB14 en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Las accesiones 11I, 12I y 13I presentan un menor número de amplicones y una baja intensidad en las bandas amplificadas en comparación con resto de accesiones. Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos.

El registro de las bandas causó dificultad cuando se presentaron perfiles con bandas poco intensa y muy cercanas entre si. En la figura 3.10 se muestra el patrón característico del primer 17899A en la población *P. incana* de los Ilinizas, donde a nivel de los 500 pb se observa el polimorfismo presentado en los individuos 2I, 3I y 11I con respecto al resto de los individuos de la población, además se observan bandas poco intensas y muy cercanas unas de otras.

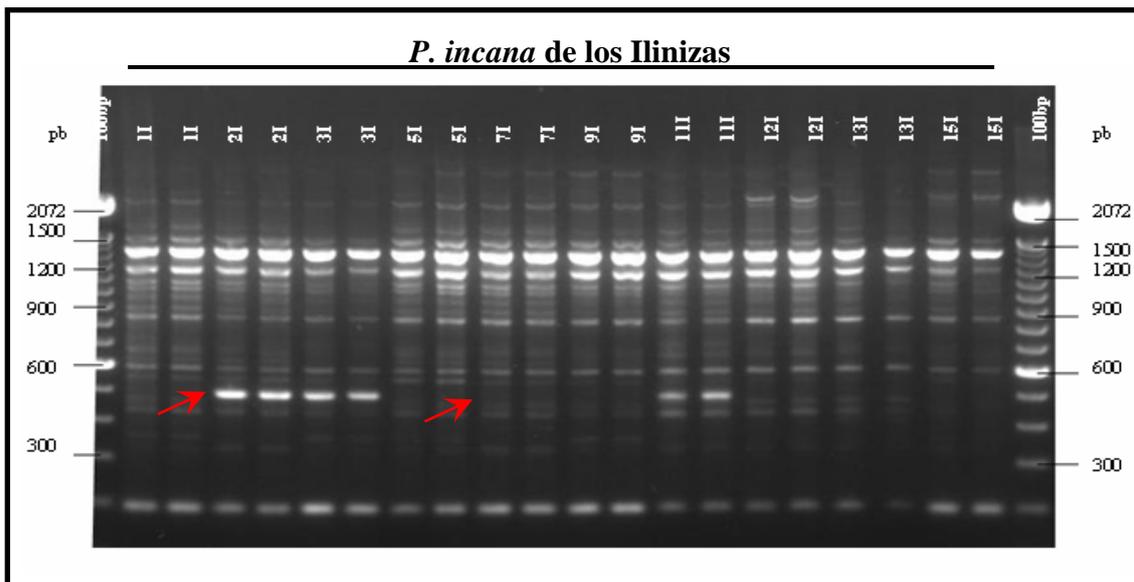


Figura 3.10 Electroforesis en gel al 1,5% de los productos amplificados con el primer 17899A en la población de *P. incana* de los Ilinizas. Entre los 300 y 1200pb hay varias bandas que presentan una baja intensidad y poca distancia entre ellas. . Se presentan dos repeticiones por cada individuo y un marcador de 100 bp DNA Ladder INVITROGEN® en los extremos.

3.4 Análisis de datos

3.4.1 Genética poblacional

3.4.1.1 Distancias genéticas y agrupamientos

Al analizar los datos generados mediante el coeficiente de similaridad de Dice se obtuvieron medidas de distancias entre cada uno de los individuos en estudio. El software utilizado dio como resultado una matriz triangular de contingencia con las similaridades entre los individuos. A partir de la matriz de similaridad se calculó una matriz de disimilaridad y al promediar los datos individuales de disimilaridad se obtuvo una medida de la diversidad genética de 0,403 entre todos los individuos de *P. incana* de los Ilinizas, *P. pauta* y *P. incana* de Papallacta y 0,289 entre los individuos de *P. incana* de las dos zonas. En cada población la medida de la diversidad genética fue de 0,237 en *P. pauta* de Papallacta, 0,134 en *P. incana* de Papallacta y 0,170 en *P. incana* de los Ilinizas (Tabla 3.3). Se calculó además los valores de diversidad genética dentro de cada parche, en el caso de *P. incana* de Papallacta los parches P1 y P2 y en *P. pauta* los parches P3, P4 y P5, mientras en *P. incana* de los Ilinizas fue un bosque continuo.

Tabla 3.3 Medidas de diversidad genética en función de similitudes y disimilitudes, dentro de cada parche, de cada población y entre poblaciones.

Población		Promedio similitudes	Promedio disimilitudes
<i>P. incana</i> de los Ilinizas		0,830	0,170
<i>P. incana</i> de Papallacta		0,866	0,134
Parches	P1	0,813	0,187
	P2	0,939	0,061
Subtotal (<i>P. incana</i>)		0,711	0,289
<i>P. pauta</i> de Papallacta		0,763	0,237
Parches	P3	0,800	0,200
	P4	0,671	0,329
	P5	0,810	0,190
Total		0,597	0,403

El coeficiente de Dice permite conocer a los individuos que tienen una mayor similitud de los que tienen una menor similitud entre sí. Así, la mayor similitud registrada fue de 0,970 entre los individuos 5I y 7I pertenecientes a la población de *P. incana* de los Ilinizas, mientras que el valor más bajo de 0,329, se registró entre 13I (*P. incana* de los Ilinizas) y 6P3 (*P. pauta* de Papallacta). Se pueden inferir con estos resultados las relaciones existentes entre todos y cada uno de los individuos del estudio.

La menor similitud de los sectores de la matriz triangular de contingencia se observó entre la población de *P. incana* de los Ilinizas y *P. pauta* de Papallacta. Los valores de similitud más altos encontrados se localizaron principalmente entre los individuos de la misma población en la especie *P. incana* en ambos páramos. Los rangos de similitud media se localizaron entre los individuos dentro de la población de *P. pauta*, así como entre los individuos de *P. incana* de los Ilinizas versus los individuos de *P. incana* de Papallacta (Figura 3.11). Lo que indica que las similitudes genéticas están en función de la especie y no de la localización geográfica.

A partir de las medidas de distancia del coeficiente de similaridad se realizó un agrupamiento UPGMA, con el cual se obtuvo un dendograma (Figura 3.13). El algoritmo para el agrupamiento UPGMA consiste en un agrupamiento aglomerativo jerárquico basado en promedios de similaridad que nos permiten considerar la relación entre grupos, por lo cual los agrupamientos deben analizarse en función de los grupos formado y no por los individuos relacionados entre sí. Se pudo observar que a partir de un promedio de similaridad de 0,45 se dividen claramente dos grupos el uno correspondiente a *P. incana* y el otro a *P. pauta*, y a partir de 0,60 se separan las dos poblaciones de *P. incana* de Papallacta y los Ilinizas. El grupo formado por la población de *P. incana* de Papallacta se encuentra más cercanamente relacionado al grupo de *P. pauta* de Papallacta que la población de *P. incana* de los Ilinizas. Todos estos datos nos indican la tendencia que tuvieron los individuos para agruparse en función de la población en la que fueron muestreados y que los individuos del estudio se diferencian en base a su especie.

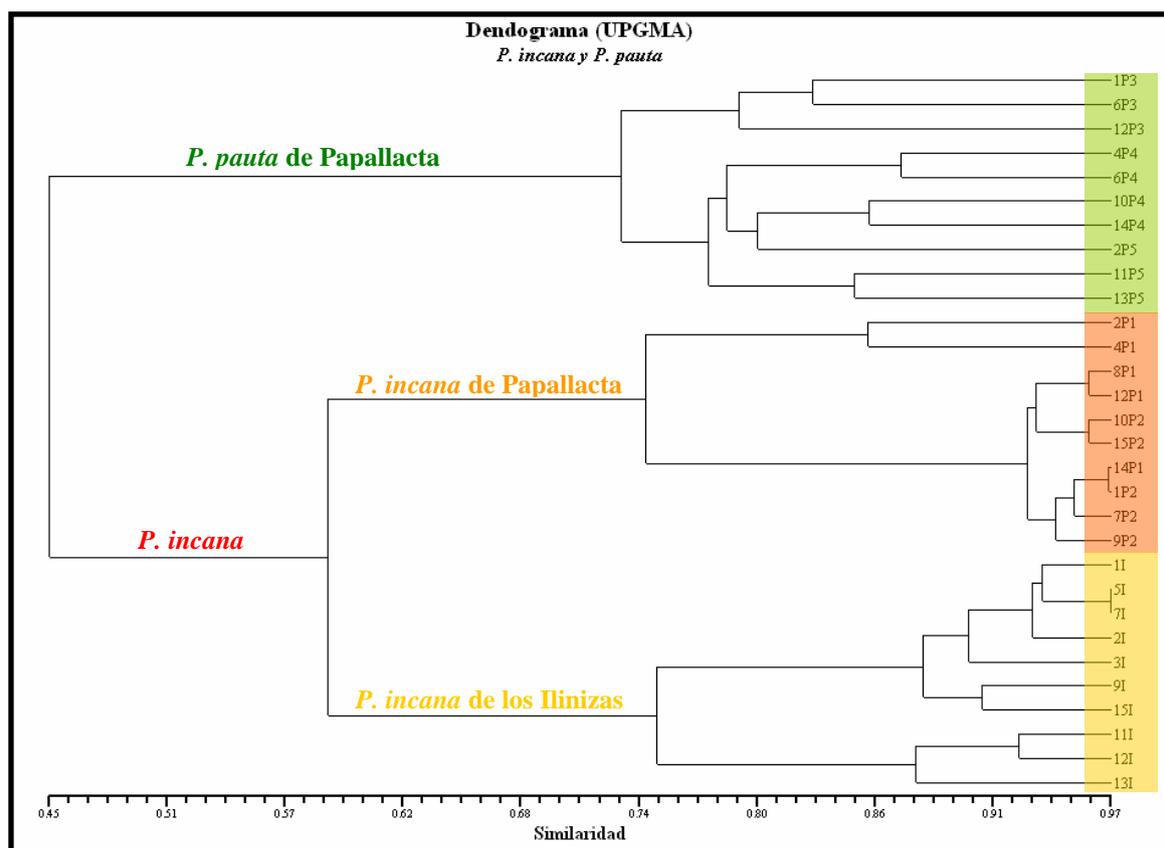


Figura 3.13. Dendrograma generado mediante un agrupamiento UPGMA en base a similaridades calculadas mediante el coeficiente de Dice. Los niveles en los que se localizan los nodos indican los valores del promedio de similaridad a partir de los cuales se separan los grupos. Los individuos con la codificación P1 y P2 corresponde a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 corresponden a *P. pauta* de papallacta y I corresponde *P. incana* de los Ilinizas.

Dentro de cada población se observa claramente en el dendograma de la figura 3.13 la formación de dos grupos y la subdivisión de los mismos. Así, en la población de *P. pauta* proveniente de la zona de Papallacta se presenta un grupo formado únicamente por los individuos 1P3, 6P3 y 12P3, que pertenecen al parche P3 de *P. pauta* de Papallacta. Los individuos de los otros dos parches P4 y P5 de la población de *P. pauta* de Papallacta no se encuentran separados en dos grupos con individuos exclusivos de estas localizaciones, debido a que el individuo 2P5 luego del análisis, se agrupó con los individuos del parche P4. En *P. incana* de la misma zona los individuos pertenecientes a las dos localizaciones muestreadas P1 y P2 no se encuentran formando grupos aislados de individuos de cada parche, más bien forman un grupo heterogéneo. En *P. incana* de la zona de los Ilinizas no se analizó la formación de grupos específicos de individuos, ya que las muestras fueron tomadas de un bosque continuo.

Utilizando la matriz de similaridades se generó otro dendograma (Figura 3.14) mediante el método del vecino más cercano (neighbor joining; NJoin), el cual permitió conocer que individuos, de las poblaciones de *Polylepis* analizadas, se encuentran más cercanamente relacionados entre sí en función de sus similaridades (McCauley & Ballard, 2002). En el dendograma (Figura 3.14) se puede observar que entre los individuos 5I y 7I existe la mayor relación de las muestras analizadas. Con un menor grado de similaridad los individuos 5I y 7I están relacionados con el individuo 1I, al mismo nivel de similaridad se relaciona el individuo 6P3 con el 12P3 y 12P1 con 14P1.

Es importante mencionar que este dendograma generado mediante NJoin nos muestra también los individuos más distantes genéticamente. Los individuos del estudio más distantes genéticamente dentro de la población de *P. pauta* de Papallacta son 1P3 y 13P5, en la población de *P. incana* de Papallacta son 2P1 y 9P2 y en la población de *P. incana* de los Ilinizas son 1I y 13I. Por tanto, al analizar consecutivamente los nodos se pueden conocer los vecinos más cercanos o lejanos de cada uno de los individuos.

En los dendogramas generados mediante los métodos UPGMA y NJoin los grupos principales de individuos se mantienen, mientras que las relaciones internas de los

grupos y entre los individuos, varían notablemente. Esto sucede porque el algoritmo con el cual se trabaja en UPGMA realiza una reducción de promedios de similitudes que solo nos permiten observar las relaciones entre los grupos, mientras que con NJoin se pueden evidenciar las relaciones entre individuos.

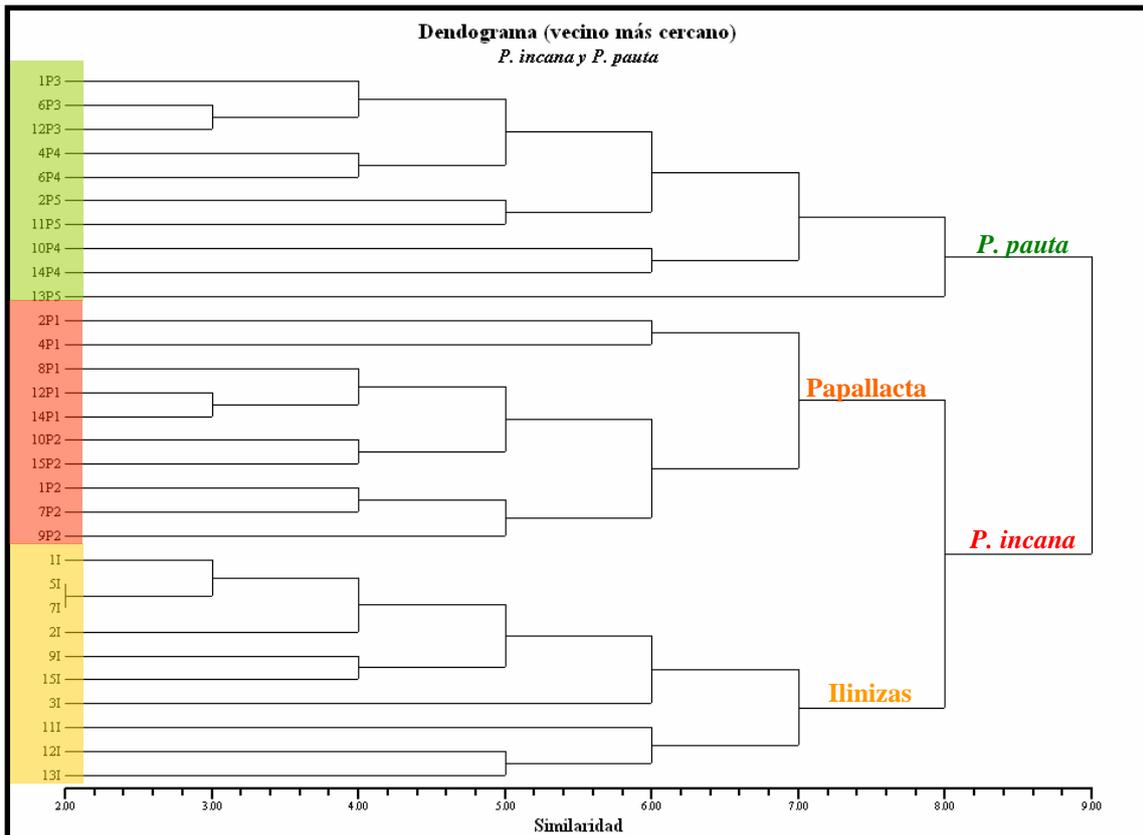


Figura 3.14 Dendrograma generado mediante el método del vecino más cercano en base a similitudes calculadas mediante el coeficiente de Dice. La cercanía de dos individuos y que estos se desprendan de una misma rama indica el grado de similitud entre ellos. Los individuos con la codificación P1 y P2 corresponde a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 corresponden a *P. pautá* de papallacta e I corresponde *P. incana* de los Ilinizas.

Se realizó además un análisis de componente principales (ACP) basado en la matriz binaria, para conocer la forma de como se agrupan los individuos en un espacio bidimensional. Mediante el gráfico generado en la figura 3.15 es evidente que los individuos se agrupan en función de las poblaciones a las cuales pertenecen. Las dos poblaciones de *P. incana* se agrupan más cercanamente que la población de *P. pautá*. Las poblaciones de *P. incana* de los Ilinizas y *P. pautá* de Papallacta presentan una distribución homogénea entre sus individuos, siendo mayor la distancia dentro de la

población de *P. pauta*. En cambio dentro de la población de *P. incana* de Papallacta se pudo observar que ocho de los diez individuos se encuentran estrechamente relacionados y los dos restantes presentan cierta distancia del resto del grupo, evidenciando una distribución heterogénea.

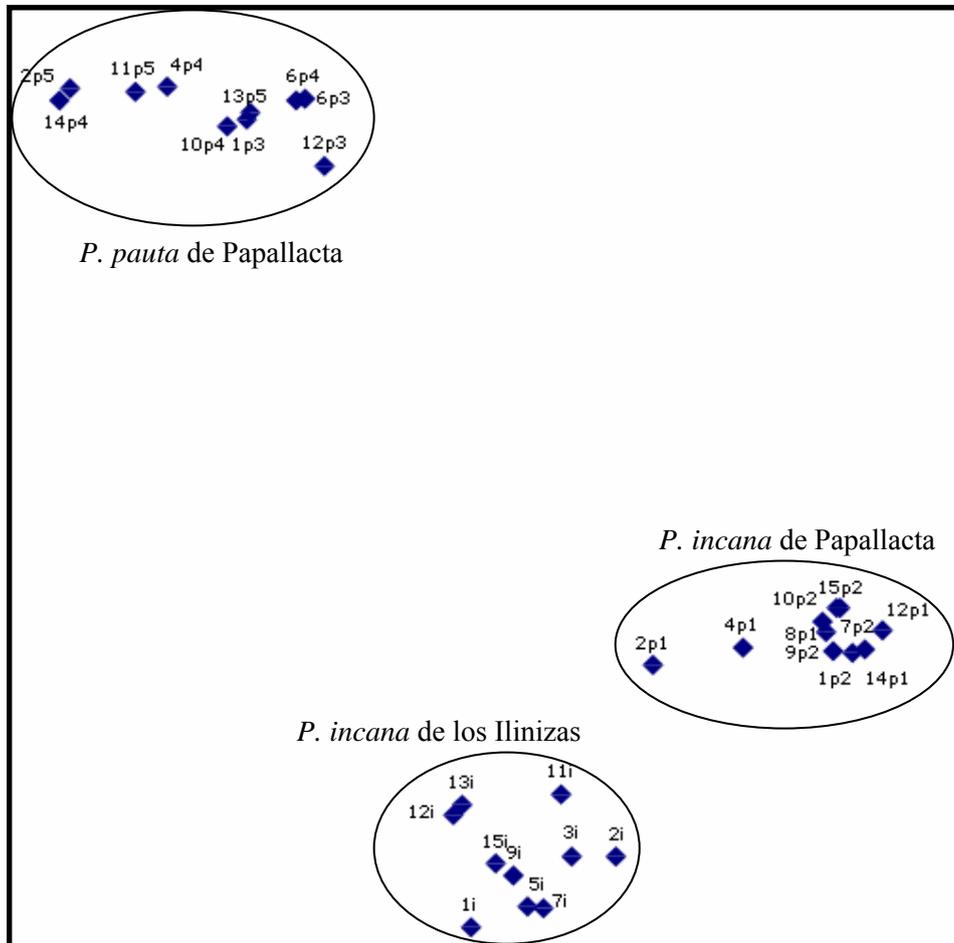


Figura 3.15 Análisis de componentes principales de los treinta individuos objeto del estudio, en base a la presencia y ausencia de bandas.

Las figuras de agrupamiento (Figura 3.13, Figura 3.14 y Figura 3.15) de este estudio muestran que existe una mayor similitud genética entre los dos poblaciones de *P. incana* en comparación con *P. pauta*. Además, cabe mencionar que dentro de *P. pauta* los individuos tienen diferencias mayores que las presentadas en las dos poblaciones de *P. incana*. Lo que indica que de las tres poblaciones analizadas *P. pauta* presentan la mayor variación genética entre sus individuos.

3.4.1.2 Diferenciación genética

Con el fin de conocer si existe o no una diferencia significativa entre las poblaciones y dentro de ellas se aplicó un AMOVA donde la significancia se la valoró con un p (probabilidad estadística) del 1%, lo que demuestra que existe un 99% de que los resultados no sean producto del azar.

Se evidenció que existe una diferencia significativa entre las tres poblaciones o al menos que una de ellas es diferente, mientras que no existe diferencia significativa entre los individuos dentro de cada población (Tabla 3.4). En un test de estructura genética con el método de diferencia de apareamiento en pares, se observó que de la variación total del fenómeno calculado existe un 67,52% entre las poblaciones y un 32,48% entre los individuos. Lo que indica que estas poblaciones presentan divergencia genética entre ellas.

Tabla 3.4 Resultados del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). La fuente de variación en este análisis son las poblaciones de *P. pauta* de Papallacta, *P. incana* de Papallacta y *P. incana* de los Ilinizas.

Fuente de variación	Porcentaje de variación	P
Entre poblaciones	67,52	0,0000 *
Dentro de poblaciones	32,48	0,34604

* Diferencia significativa

Al realizar el AMOVA por grupos (tabla 3.5), se encontró que existe una diferencia significativa entre las poblaciones de *P. incana* y *P. pauta*, ya que existe diferencia significativa entre las dos poblaciones de *P. incana*. En el test de estructura genética se observó que de la variación total del fenómeno calculado existe un 11,12% dentro del grupo *incana*, un 57.61 % entre poblaciones y 31.28 % dentro de las poblaciones.

Tabla 3.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). La fuente de variación son las poblaciones del estudio que se encuentran en dos grupos en el primero *Polylepis incana* de Papallacta y los Ilinizas y en el segundo *P. pauta* de Papallacta. Se muestran los porcentajes de variación y valores de significancia estadística.

Fuente de variación	Porcentaje de variación	P
Entre grupos	57,61	0,0000 *
Entre poblaciones dentro de grupos	11,12	0,0000 *
Dentro de poblaciones	31,28	0,34604

* Diferencia significativa

3.4.1.3 Relaciones biogeográficas

Para conocer si existe relación de las similaridades y/o disimilaridades con la localización geográfica donde se recolectó cada muestra se aplicó un test de Mantel que buscó la correlación entre las distancias genéticas y distancias geográficas. Tanto la matriz de similaridad como la matriz de disimilaridad mostraron valores de correlación muy bajos con la matriz de distancias geográficas (Tabla 3.6). Además, el valor de significancia (valorándose la significancia con un p del 1%) permitió conocer que las distancias entre los puntos de la matriz geográfica no se correlacionan significativamente con las distancias genéticas.

Tabla 3.6 Test de Mantel calculado a partir de las matrices de similaridad y disimilaridad genética versus la matriz de distancias geográficas. Se muestran los valores de correlación y de significancia estadística entre las matrices.

Distancia	Correlación	P
Similaridad genética vs distancia geográfica	0,02123	0,6683
Disimilaridad genética vs distancia geográfica	-0,06000	0,1066

* Significativo estadísticamente

3.4.2 Análisis de primers

A partir de la amplificación de los treinta individuos de estudio con los diez primers utilizados (*ver materiales y métodos*, Tabla 2.2 y 2.3) se obtuvieron 211 bandas, lo cual da un promedio de 21 bandas por primer. De las 211 bandas 202 son polimórficas, lo que equivale a un 95,7% de las bandas totales. Se tomó como banda polimórfica a aquella que muestre presencia o ausencia en al menos uno de los treinta individuos, como es el caso de la banda de 500pb que presenta en todos los individuos menos en el 2P1 (Figura 3.8).

Los primers que presentaron el mayor número de bandas polimórficas son 17898B y 17899A y el primer que presentó menos bandas polimórficas fue 17899B (Tabla 3.7). Estos datos proveen importante información, ya que los primers que presentaron el mayor número de bandas polimórficas son más útiles en la separación de los genotipos.

Tabla 3.7 Número de bandas polimórficas y monomórficas por primer.

Primer	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas
17898A	19	2
17898B	23	1
17899A	23	1
17899B	17	0
HB9	21	0
HB11	21	1
HB12	19	2
HB14	19	0
844A	22	0
844B	18	2

Además, se calculó el poder de resolución de cada primer, el cual consiste en la capacidad que tiene cada primer de dividir a todos los genotipos en dos grupos. Para ello se calculó el índice de banda (Ib) de las 211 bandas y se sumaron los valores correspondientes a cada primer para obtener el valor de resolución de primer (Rp). El

primer que presento el Rp más alto fue el 844A con un valor de 13,8; el primer que presentó el menor valor fue el 17899B con 9,40 (Tabla 3,8). Lo que indica que el primer 844A fue el que más información aportó para la separación de los genotipos en este estudio.

Tabla 3.8 Valores de resolución de primer los 10 primers del estudio

Primer	Resolución del primer
17898A	12,07
17898B	12,80
17899A	13,33
17899B	9,40
HB9	11,47
HB11	9,47
HB12	10,00
HB14	9,47
844A	13,80
844B	10,47

Se realizó un análisis factorial de correspondencias múltiples (AFKM) para conocer la relación de cada uno de los primers con las especies y los páramos que se han analizado en este estudio. Primero, se analizó la relación de los primers con las localidades (Figura 3.16), donde se puede observar que en Papallacta el primer que presentó más bandas fue el HB11, mientras que en los Ilinizas fue el 17899A.

Los primers que presentaron una distribución cercana y relativamente equidistante entre los dos páramos son el 17898A y 844A, lo que significa que generaron un número similar de bandas en la localización de los Ilinizas y Papallacta. Otros primers como el 17898B tienden a estar equidistantes de ambas localidades pero muy alejados, mientras que primers como el 844B muestran una tendencia totalmente marcada hacia un solo páramo. Es conveniente conocer los primers que generan un mayor número de bandas en cada localización, ya que así aumenta la probabilidad de que estos primers puedan diferenciar los distintos genotipos.

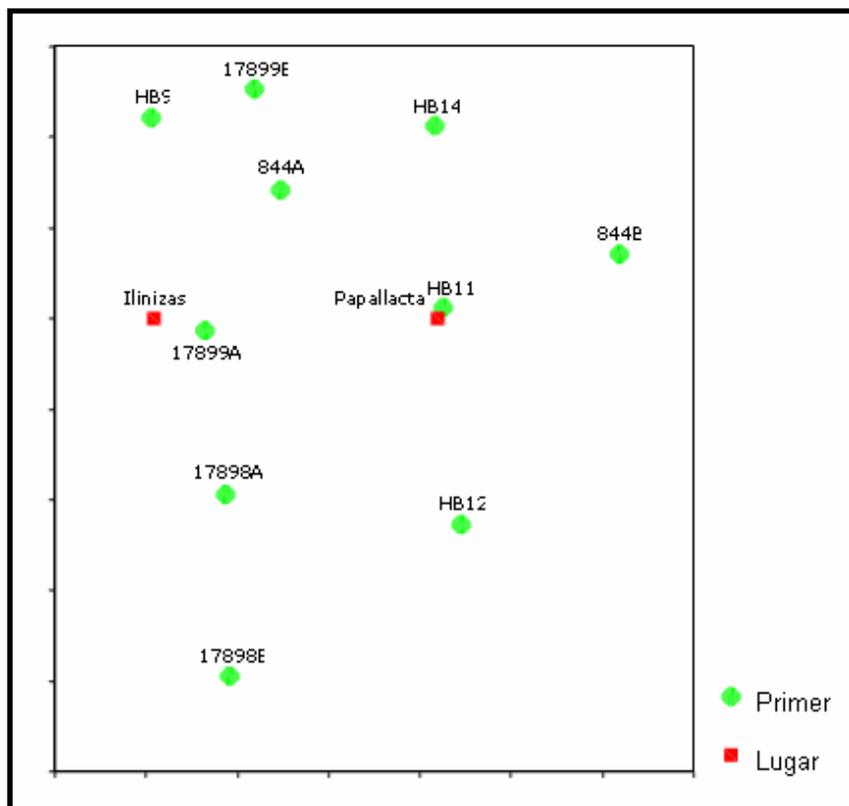


Figura 3.16 Análisis factorial de correspondencias múltiples entre los diez primers y los páramos de Papallacta y los Ilinizas. La cercanía de los primers al páramo indica la presencia de una mayor cantidad de bandas en esa localidad.

Al realizar el AFCM relacionando los primers con las dos especies analizadas (Figura 3.17), se observó que un grupo de cinco primers presentan una relación relativamente uniforme con las dos especies, estando ligeramente más cercanos a *P. incana* los primers 844B y 17899A; y más cercanos a *P. pauta* HB11 y HB12. El primer HB9 muestra la mejor tendencia equidistante entre las dos especies y el primer más lejano de todos con tendencia a *P. incana* es el 17898B. De igual manera que en el AFCM anterior (Figura 3.17) es conveniente conocer los primers que generan un mayor número de bandas en cada especie, ya que así aumenta la probabilidad de que estos primers puedan diferenciar los distintos genotipos.

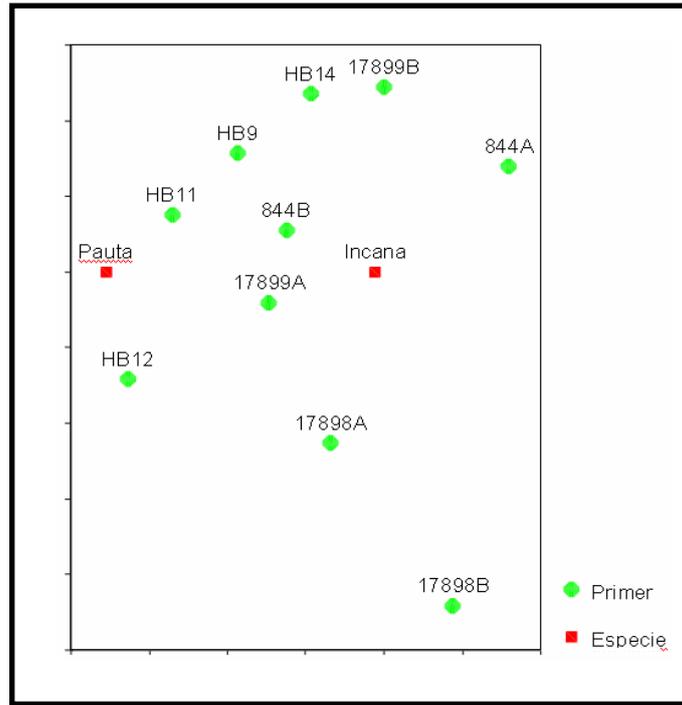


Figura 3.17 Análisis factorial de correspondencias múltiples entre los diez primers y las especies *P. incana* y *P. pauta*. La cercanía de los primers a la especie indica la presencia de una mayor cantidad de bandas en esa localidad.

Para conocer la tendencia que tuvo cada primer en la separación de los genotipos se realizó un análisis de componentes principales individualmente con cada primer. En la figura 3.18 se muestra el ACP generado mediante el primer 17899A, el cual presentó el segundo Rp más alto.

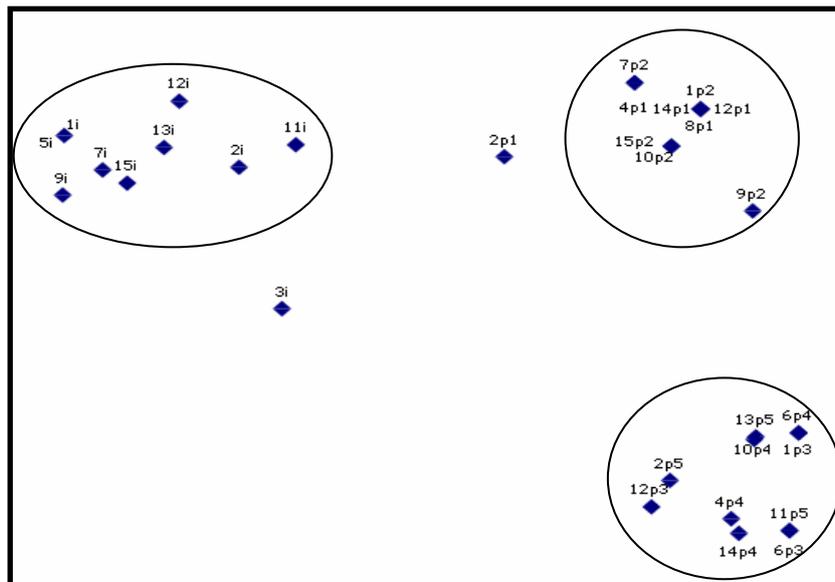


Figura 3.18 ACP con el primer generado mediante el primer 17899A. Los códigos P1 y P2 pertenecen a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 a *P. pauta* e I a *P. incana* de los Ilinizas.

Además, se observó que cada primer da lugar a tendencias diferentes como es el caso del primer 844A, cabe recalcar que este primer presentó el valor más bajo de Rp (poder de resolución del primer) y esto se demuestra en la falta de estructura que presenta el ACP generado mediante este primer (Figura 3.19). Por ello, es clara la necesidad del uso de un amplio set de primers para obtener una información más completa y certera.

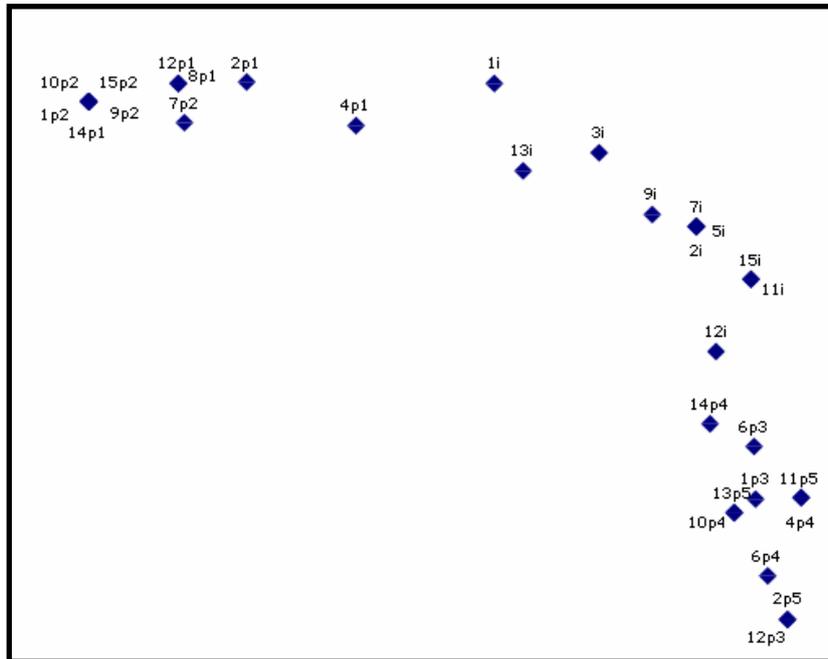


Figura 3.19 ACP con el primer 844B. Los códigos P1 y P2 pertenecen a *P. incana* de Papallacta, P3, P4 y P5 a *P. pauti* e I a *P. incana* de los Ilinizas.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 Estandarización de las técnicas moleculares

Al analizar los resultados de los diferentes protocolos de extracción de ADN que se realizaron en este estudio (*Resultados*, ver apartado 3.1) se pudo determinar que el protocolo de Khanuja *et al.* (1999), permitió obtener la mayor concentración y calidad de ADN (no se observó degradación ni rastros de compuestos contaminantes). La mayor concentración de ADN puede deberse a que este protocolo emplea no solo un mayor volumen de buffer de extracción, lo cual permite que aumente la superficie de contacto entre las células y la buffer, sino un mayor tiempo de incubación que permite una mayor acción de los compuestos de la buffer de extracción con la muestra. La concentración del CTAB es diez veces mayor que la usada en los diferentes protocolos (Doyle & Doyle, 1987; Edwards *et al.*, (1991) y Porebski *et al.*, 1997), este reactivo es el que incrementa la lisis celular gracias a la solubilización de los lípidos de la membrana. Con este protocolo inclusive se logra eliminar una mayor cantidad de proteínas al agitar durante al menos quince minutos la muestra con el CIA (cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), debido a que la formación de la emulsión con cloroformo permite una mayor área de contacto de este reactivo con la solución de lisis celular. Finalmente, al mantener la muestra a -20°C durante la precipitación con etanol y NaCl se disminuye la actividad de las moléculas de agua lo que facilita una precipitación más eficiente del ADN (Surzycki, 1999).

En la mayoría de los casos de las extracciones de ADN con los protocolos de Doyle & Doyle (1987), Edwards *et al.* (1991) y Porebski *et al.* (1997) se observaron bandas poco definidas, con baja concentración de ADN y con gran cantidad de contaminantes en muchos de los casos (*Resultados*, ver Figura 3.1, 3.2 y 3.3). La presencia de moléculas contaminantes puede deberse a que durante los protocolo no se da una buena limpieza con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), donde el cloroformo desnaturaliza las cadenas polipeptídicas y segundo las elimina por arrastre de moléculas con colas hidrofóbicas que quedan atrapadas en la interfase agua-cloroformo (Lehninger, 1981;

Surzycki, 1999). Dependiendo del caso puede existir la acumulación del detergente usado en la lisis celular (Surzycki, 1999).

La baja concentración de ADN pudo ocurrir debido a la degradación del ADN por acción de las DNAsas al usar agua ultra pura y no TE. Uno de los reactivos que forma parte del TE es el EDTA el cual es un quelante de iones Mg, el cual es un poderoso inhibidor de las DNAsas debido a que el ión Mg es un cofactor para su actividad (Lehninger, 1981). Además, la baja concentración del ADN puede sustentarse en la utilización del fenol, ya que este compuesto en estado de saturación contiene un 20% de agua, atrapando por ende un 20% del ADN (Surzycki, 1999).

4.2 Estandarización de las condiciones para la amplificación de ISSRs

En cuanto a las amplificaciones de ISSRs fue necesaria la estandarización de las temperaturas de alineamiento, donde se tomaron las temperaturas más específicas que evitaron que el primer se pegue en sitios que no sean totalmente complementarios (Casasoli *et al.*, 2001). Algunas temperaturas optimizadas no tuvieron una relación directa con las temperaturas calculadas teóricamente en base a la temperatura de melting (Nagaoka, & Ogihara 1997; McCauley & Ballard, 2002; Shen *et al.*, 2006 y Prevost & Wilkinson, 1999). Sin embargo, las temperaturas de otros primers coincidieron con trabajos como el realizado por Casasoli *et al.* (2001).

Con referencia a la estandarización del MgCl₂ fue necesaria la reducción de su concentración para la amplificación de algunas secuencias ISSRs. En base a los trabajos de McCauley & Ballard (2002), Shen *et al.* (2006), Prevost & Wilkinson (1999) y Casasoli *et al.*, (2001) se utilizaron concentraciones de 1,2 mM a 1,8 mM de MgCl₂. La reducción de MgCl₂ se la realizó para evitar la amplificación de una gran cantidad de bandas poco intensas e inespecíficas, debido a que el MgCl₂ es un cofactor de la DNA polimerasa y al disminuir la concentración del cofactor se evita una exagerada actividad de la enzima la cual puede ser inespecífica (Rickwood & Homes, 1995).

Para mejorar la eficiencia analítica, se debe optimizar en conjunto la concentración de MgCl₂ y la temperatura de alineamiento, factores que influyen en la extensión del primer y la fidelidad del templado. La concentración de los iones Mg y las condiciones circundantes son las principales variables a optimizar, sin embargo, la temperatura de alineamiento juega un rol significativo en estas condiciones (Shen *et al.*, 2006).

4.3 Amplificación de los marcadores ISSRs

Los marcadores ISSRs mostraron ser altamente reproducibles (Nagaoka, & Ogihara, 1997) ya que los patrones de bandas, observadas en los ensayos, se presentaron iguales en las dupletas realizadas. Aunque, en las amplificaciones pueden darse errores por varias causas como la contaminación de la muestra, artefactos bioquímicos, errores humanos, baja calidad de DNA, homoplasia de alelos y errores al registrar las bandas (Barth *et al.*, 2002; Bonin *et al.*, 2007). Los errores en el registro de bandas pueden representar la mayor parte de los problemas con este tipo de datos. Esto se da principalmente debido a la subjetividad en la lectura de los perfiles de las bandas especialmente cuando hay diferencias en la intensidad de las bandas entre individuos o corridas electroforéticas (Bonin *et al.*, 2007).

A partir de los diez primers (*Materiales y métodos*, ver Tabla 2.3) usados en la presente investigación se generaron 211 bandas, mostrando que las repeticiones di y trinucleótidas son muy útiles para amplificar bandas polimórficas (Barth *et al.*, 2002). De las 211 bandas amplificadas el 95,7% de ellas fueron polimórficas, es un porcentaje bastante alto, ya que en otros estudios de genética poblacional se han encontrado valores entre 78% a 90% (Culley *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2006). La cantidad de bandas polimórficas generadas mediante cada primer no está directamente relacionada con la capacidad que tuvo este para diferenciar varios grupos de genotipos (Culley *et al.*, 2007). A pesar de ello no deja de ser importante la generación de un alto número de bandas, ya que con ello se escasean tantos loci como sean posibles y se obtienen una mayor cantidad de información (Storz, 2005).

Los valores del poder de resolución del primer (Rp), en comparación con los valores de polimorfismos, ofrecen una visión mucho más real de capacidad discriminatoria de un primer o set de primers. En trabajos previos se ha visto una fuerte relación lineal ($r^2=0,98$) entre los valores Rp y la proporción de cultivares que los primers pueden diferenciar. Esta relación entre los valores Rp y la diferenciación de cultivares se da con primers que tengan valores altos de Rp. De acuerdo a Prevost & Wilkinson (1999), valores de Rp de 6,9 pueden diferenciar aproximadamente 34 genotipos y valores menores a 6 escasamente diferencian algunos cultivares. Los valores de Rp en nuestro estudio varían entre 9,4 y 13,8, por ello son muy útiles en la diferenciación de genotipos.

En base a lo descrito anteriormente se ha encontrado que *Polylepis* en los bosques del estudio es un grupo homogéneo y que es necesaria la utilización de metodologías que produzcan suficientes caracteres informativos que permitan evidenciar las relaciones y diferencias del grupo (Lizarzaburu, 2002).

4.4 Distancias genéticas

En base a los valores de similaridad genética se determinó que los tres bosques de *Polylepis* analizados presentan una diversidad genética del 40,3% siendo un porcentaje medio al considerar que se han analizado solamente dos especies. En el caso del género *Polylepis* se ha visto que la similitud genética entre las diferentes especies es el resultado de uno o varios de los siguientes factores: la limitada divergencia genética después de la especialización, la dispersión continua del polen por grandes distancias o los trasplantes recientes (Kessler & Shmidt, 2006; Simpson, 1979). Se ha podido conocer que las especies forestales exhiben los niveles más elevados de variación en comparación con otros grupos de organismos. El nivel de polimorfismo detectado en plantas leñosas resulta ser incluso superior al detectado en especies herbáceas, debido a que las especies forestales se caracterizan por poseer una amplia dispersión, alta longevidad, entre otros (Harmrick, Linhart, & Mitton, 1979).

Las especies de *Polylepis* están ampliamente distribuidas ya que se encuentran formando parches a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta Argentina (Kessler, 1995). Se ha observado previamente que en las especies con una amplia distribución geográfica generalmente varía la cantidad de diversidad genética (Godt & Hamrick, 1993). Lo cual sustenta que nuestros datos de diversidad genética son diferentes entre cada una de las poblaciones en un rango bajo (13,4; 2,37 y 1,70%).

La diversidad genética entre individuos de la misma especie (*P. incana* de Papallacta y de los Ilinizas) es del 28,9%, lo cual concuerda con algunos trabajos realizados en especies forestales donde la diversidad genética ha variado de 0 a 36% (Iglesias y Casas, 2004; Ledig, 1992).

Los valores de diversidad genética son bastante bajos al considerarlos dentro de cada población, ya que se ha visto que las especies arbóreas se caracterizan por poseer elevados niveles de variación genética dentro de las poblaciones y bajo entre poblaciones (Kwak, Velterop & Andel, 1998).

En la población de *P. pauta* de Papallacta se observó el valor de diversidad genética más alto en comparación con las tres poblaciones analizadas, en un 10% y 6% superior a *P. incana* de Papallacta y *P. incana* de los Ilinizas respectivamente. La localización del parche P4 mostró el valor más alto de diversidad genética de todo el estudio. El parche P4 tiene una localización relativamente central en el bosque de *P. pauta*, lo que favorece un mayor grado de diversidad genética (Godt & Hamrick, 1993) en comparación con las localizaciones P3 y P5 que se encuentran en los extremos periféricos de la población. Las poblaciones marginales poseen una cantidad reducida de diversidad genética comparada con las poblaciones centrales, debido a que son producto del establecimiento de un pequeño número de individuos que contienen un porcentaje de la diversidad o por otro lado contienen variantes genéticas únicas o poco comunes de la especie (Amsellem, Noyer, Le Bourgeois, & Hossaer, 2000; Godt & Hamrick, 1993; Yeh & Layton 1979).

En cambio, para *P. incana* de Papallacta se observó el valor más bajo de diversidad genética, llegando incluso a presentarse dentro de una de las localizaciones muestreadas (P2) un porcentaje del 6,1%. El parche P2 se caracterizó por encontrarse aproximadamente en la parte media del bosque de *P. incana* en Papallacta, mientras que en el parche P1, que se localizó en el extremo inicial del bosque, presentó un valor promedio de diversidad genética del 18,7%. Por consiguiente, los individuos de la localización P1 presentan en un rango muy pequeño una diversidad mayor a P2, estos valores de cierta manera son contradictorios a previas asunciones en las que se considera que la diversidad genética es reducida en las poblaciones marginales en comparación con las poblaciones centrales (Amsellem *et al.*, 2000; Yeh & Layton 1979).

Sin embargo, se ha visto que una baja cantidad de diversidad genética no siempre va a ser característica de las poblaciones marginales (McCauley & Ballard, 2002). El considerar a P2 como una población central también podría no ser acertado ya que el bosque es más largo que ancho, por ello, no posee un núcleo claramente definido, pudiéndose de esta manera considerar a ambas localizaciones como marginales. Lo cual concuerda con que las poblaciones marginales que se encuentran formando parches o en los márgenes poseen una menor variabilidad genética que las poblaciones centrales (Amsellem *et al.*, 2000; Eckert, Samis & Loughheed, 2008; Godt & Hamrick, 1993; Yeh & Layton 1979).

La población de *P. incana* de los Ilinizas se mantiene al igual que las otras poblaciones con niveles bajos de diversidad genética siendo este un patrón común en muchas especies en peligro (Lesica & Allendorf, 1995; Shen *et al.*, 2006). Entre las dos poblaciones de *P. incana* analizadas existe una alta similaridad genética, a pesar de la distancia y barreras geográficas entre estos bosques, apoyando la teoría de que *Polylepis* formaba un bosque continuo en la cordillera de los Andes (Troya, 2006).

4.5 Agrupamientos y biogeografía

El dendograma UPGMA indica que las poblaciones, generalmente, se agrupan de acuerdo a su localización geográfica. Este tipo de agrupamiento permite considerar únicamente las relaciones entre grupos, porque la información acerca de las relaciones entre pares se pierde en métodos basados en la reducción progresiva de la matriz de similitudes. Los resultados generados por agrupamientos UPGMA pueden ser extrapolados para toda la población cuando se ha llevado a cabo un muestreo al azar. El dendograma generado mediante el agrupamiento de NJoin puede dilucidar la relación entre los individuos de las poblaciones de mejor manera que con el método UPGMA. Con el agrupamiento de NJoin es posible identificar vecinos si ellos están conectados a través de un nodo interno único (Legendre & Legendre, 2000).

Con el análisis de componentes principales se determinó que los individuos se agrupan de acuerdo a su población designada. Además, la distribución de los individuos dentro de cada población corroboró que en *P. pauta* de Papallacta los individuos se encuentran más diferenciados que en las otras dos poblaciones de *P. incana*. En todos los agrupamientos realizados se observó el mismo patrón en que los individuos se agrupan de acuerdo a las poblaciones a las que pertenecen. Las dos poblaciones de *P. incana* se encuentran más cercanas entre sí, debido a que son de la misma especie, en relación a *P. pauta*. En ciertos casos, se ha visto que la señal filogenética de los análisis puede ser eclipsada por un alto grado de agrupamiento parcial de acuerdo a la proximidad geográfica (Schmidt, Kessler, & Kumar, 2006), mostrando la influencia de las características del lugar donde se localizan las diferentes poblaciones.

Mediante los métodos de agrupamiento UPGMA, NJoin y ACP se presentan grupos claramente definidos de acuerdo a la ubicación geográfica de las poblaciones, sin embargo, mediante el test de Mantel la correlación entre las distancias geográficas y genéticas es muy baja y no es significativa. Lo que muestra una estructura genética pobre con una pobre correlación entre la distancia geográfica y genética. Por ello se presume que la falta de estructura genética se debe a flujo de genes (Schmidt, 2005) ocasionados de manera natural (polinización anemófila) y por la acción antropogénica

(reforestaciones) (Renison, 2006). De igual manera, parece que las especies nunca se estabilizan suficientemente a través del aislamiento ecológico y/o geográfico (Schmidt *et al.*, 2006). Esto se correlaciona con diversos estudios que han puesto en evidencia que el rango geográfico no siempre es un indicador preciso de la variación genética de las poblaciones (Iglesias y Casas, 2004). La variación genética cuantitativa de una especie vegetal está íntimamente ligada a las condiciones medioambientales que prevalecen en el ciclo de vida de la misma, de modo que la estrecha relación planta medio ambiente marca la importante propiedad para la especie vegetal de poseer la suficiente flexibilidad de desarrollo para existir en las condiciones donde se ubican (Harmrick *et al.*, 1979). Por ello, los resultados de este trabajo sugieren que las poblaciones analizadas no está lo suficientemente adaptadas para las localizaciones donde se desarrollan.

4.6 Diferenciación genética

A partir de los resultados obtenidos mediante el AMOVA se deduce que no existe diferencia significativa entre los individuos dentro de las poblaciones, la cual puede deberse a diversos factores que afectan las frecuencias alélicas en las poblaciones como son la deriva génica dentro de la cual se dan cuellos de botella y el efecto fundador (Culley *et al.*, 2007).

En el AMOVA realizado entre las tres poblaciones se encontró una diferencia significativa, lo cual se traduce en que al menos una de las tres poblaciones es diferente y mediante el AMOVA por grupos se pudo observar que existe diferencia significativa incluso entre las dos poblaciones de *P. incana*. Además, al tomar en cuenta el porcentaje de varianza del 67,52% distribuido entre las poblaciones analizadas sugiere cierto grado de divergencia genética entre las poblaciones. Esta varianza puede deberse a la fragmentación del hábitat (Culley *et al.*, 2007), porque la fragmentación en general disminuye la variación genética dentro de las poblaciones e incrementa la diferenciación genética entre poblaciones (Young *et al.*, 1996). Esto puede ocurrir en áreas con alteraciones antropogénicas o geográficas, si existen barreras substanciales que lleven a la deriva génica en poblaciones (Ledig, 1992).

Es necesario analizar que la mutación, es fuente de nueva variabilidad genética, aun cuando la migración incrementa la variabilidad genética a nivel local pero no a nivel global. Sólo la selección natural tiene la capacidad de disminuir la variabilidad genética en un nivel global aun cuando la deriva génica la disminuye a nivel local. La migración, selección, deriva génica y sistema de cruzamiento modifican las frecuencias genotípicas, pero en particular la deriva génica y el sistema de cruzamiento incrementan la proporción de los genotipos homocigotos. La deriva génica y la selección natural pueden tener el mismo efecto de hacer divergir a las subpoblaciones de una especie y la migración en ese contexto las hará converger, siendo entonces una fuerza opuesta a las anteriores (Bernstein y Bernstein 2003; Biggs *et al.*, 2003; Campbell *et al.*, 2001; Lewin, 2001; Nason, 1976).

Con este trabajo se ha evidenciado el nivel medio de diversidad genética que se presenta en los bosques analizados, además de la baja diversidad genética dentro de las poblaciones y la alta divergencia entre poblaciones. Esto sugiere que dentro de las poblaciones analizadas no se está generando una respuesta adaptativa, ya que esta respuesta es propia de árboles forestales con una alta variabilidad intrapoblacional (Harmrick *et al.*, 1979).

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

El protocolo modificado de Khanuja *et al.* (1999) es ideal para la extracción de ADN de *Polylepis*, ya que permite obtener una alta concentración de ADN y elimina los metabolitos secundarios que interfieren en la extracción.

Los marcadores ISSRs son útiles para estudiar la diversidad genética en *Polylepis* debido a que en un corto tiempo se genera un gran número de marcadores moleculares altamente informativos adecuados para especies no estudiadas con anterioridad, siendo este el caso de *Polylepis*.

El poder de resolución de los primers utilizados en el estudio fue alto con ciertas variaciones entre ellos. Estas variaciones se reflejaron en la diferente capacidad que tuvo cada primer en distinguir los diferentes genotipos, mostrando la necesidad de utilizar no un solo un primer sino un conjunto de ellos para obtener la mayor cantidad de información posible.

La mayor diversidad genética presentada en *P. pauta* de Papallacta, en base a los valores promedio de los coeficientes de similaridad y al ACP, muestran que entre los individuos de esta población se está dando un mayor flujo génico que dentro de las dos poblaciones de *P. incana* estudiadas.

Entre las tres poblaciones de *Polylepis* analizadas existe divergencia genética, basada en la alta diversidad encontrada entre poblaciones y a la diferencia significativa entre ellas. Dentro de las poblaciones, en cambio, se presenta una alta similaridad genética y una carencia de diferencia significativa entre los individuos de las mismas.

La variabilidad genética encontrada posiblemente es un indicador de un problema de fragmentación de hábitat y deriva génica, debido a los indicios de divergencia genética entre las poblaciones y la disminución de la disimilaridad de los individuos dentro de ellas. La causa de esto puede estar basada en la distribución discontinua que se observa en los bosques de *Polylepis* que forman parches.

La baja diversidad genética dentro de las poblaciones y la divergencia entre ellas, sugiere que en las poblaciones analizadas no se está generando una respuesta adaptativa al medio. La respuesta adaptativa es propia de árboles forestales con una alta variabilidad intrapoblacional.

En comparación con las poblaciones centrales de los bosques analizados no se evidenció que la diversidad genética en las poblaciones marginales sea reducida. En el caso de *P. pauta* existe cierta tendencia en la que los individuos de la localización considerada como central presentaron una diversidad genética ligeramente mayor a la de los individuos de las partes periféricas del bosque. En *P. incana* no existió relación entre la mayor diversidad genética y la localización central de las poblaciones.

La relación entre las tres poblaciones estudiadas se da principalmente por la especie a la que corresponden, más no por el sitio donde se localizan. *P. incana* de Papallacta se agrupa de manera más cercana a *P. incana* de los Ilinizas que a *P. pauta* de Papallacta.

Las poblaciones de *P. pauta* y *P. incana* de Papallacta presentan diferencia significativa entre ellas y en los test de agrupamiento *P. incana* de Papallacta tiende a agruparse cerca de *P. incana* de los Ilinizas y no cerca de *P. pauta*, lo que indica que no se están dando procesos de hibridación entre estas dos poblaciones.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

La mayoría de los programas y algoritmos para análisis genéticos están diseñados para datos codominantes, por lo cual, se debe cautelosamente adaptar el diseño experimental al objetivo del estudio, favorecer las herramientas estadísticas específicas y robustas, estar concientes acerca de las hipótesis planteadas y poder comprobar su validez biológica.

Se recomienda utilizar los valores R_p para conocer la capacidad discriminatoria de los primers en lugar de utilizar los valores P_p , debido a que los valores R_p presentan una fuerte relación lineal con la proporción de genotipos diferenciados.

En futuras aplicaciones de marcadores ISSRs se recomienda la utilización de geles de poliacrilamida para incrementar el número de bandas visualizadas en el gel, lo cual proveerá una mayor cantidad de información.

Este trabajo aporta información valiosa para la conservación de los bosques de *Polylepis*, ya que nos permiten inferir los procesos históricos que han llevado a su actual distribución. Además, nos permite tomar conciencia acerca de la fragilidad de estos bosques causada por los procesos de fragmentación de hábitat y deriva génica que los están afectando y que en un futuro limitarán la capacidad de adaptación a condiciones ambientales adversas y resistencia patógenos.

Por ello, es recomendable promover la restauración ecológica de estas zonas mediante el material de los propios páramos para no poner en riesgo el acervo genético nativo de nuestro país. Para lo cual, sería adecuado utilizar técnicas de cultivo *in vitro* para la germinación de semillas y para la rápida multiplicación de plantas a partir de diferentes tejidos vegetales, siendo en este caso lo más apropiado el uso de meristemas

para la generación de una planta a partir de un individuo tomado del bosque y no la generación de callos y la multiplicación de plantas a partir de ellos.

Al buscar la conservación de ciertas zonas no hay que olvidar el factor humano. Las personas que habitan en áreas cercanas a los bosques de *Polylepis* necesitan explotar de cierta manera los recursos para poder sobrevivir, por ello no se puede simplemente exigir que dejen de utilizar los recursos de estos bosques, porque si lo hacen pueden estar poniendo en grave riesgo los medios de subsistencia de los habitantes de esta zona. Es imprescindible buscar alternativas sustentables que permitan la conservación los bosques de *Polylepis* y la supervivencia de los campesinos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Allainguillaume, J., Wilkinson, M., Clulow, S., & Barr, S. (1997). Evidence that genes from the male parent may influence the morphology of potato dihaploids. Theoretical Applied Genetics, 94, 241-248

Amselleml, L., Noyer, J., Le Bourgeois, T., & Hossaert-McKey M. (2000). Comparison of genetic diversity of the invasive weed *Rubus alceifolius* Poir. (*Rosaceae*) in its native range and in areas of introduction, using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Molecular Ecology, 9, 443-455.

Barth, S., Melchinger A., & Lubberstedt, T. (2002). Genetic diversity in *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. investigated by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Molecular Ecology, 11, 495-505

Biggs, A., Kapicka, C., y Landgren, L. (2003). Biología la dinámica de la vida. Colombia: McGraw Hill.

Bernstein, R., y Bernstein, S. (2003). Biología. Colombia: McGraw Hill

Bonin, A., Ehrich, D., & Manel, S. (2007). Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. Molecular Ecology, 16, 3737-3758

- Bucher, E., & Schofield, C. (1981). Economic assault on chagas disease. New Scientist, 81, 321-324.
- Campbell, N., Mitchell, L., y Reece, J. (2001). Biología conceptos y relaciones. Méjico: Pearson Education.
- Caetano, G., & Gresshoff, P. (1998). DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. Tennessee: Wiley-Liss.
- Casasoli, M., Mattioni, C., Cherubini, M., & Villani, F. (2001). A genetic linkage map of *European Chestnut (Castanea sativa Mill.)* based on RAPD, ISSE and isozyme markes. Theor. Appl. Genet., 102, 1190-1199
- Cevallos, J. (1997). La desertización en Manabí. Memoria Seminario Taller Biodiversidad y Desertización, Manta 19 –22
- Cierjacks, A., Iglesias, K., & Hensen I. (2007a). Impact of sowing canopy cover and litter on seedling dynamics of two *Polylepis* species at upper tree lines in central Ecuador. Journal of Tropical Ecology, 23, 309-318.
- Cierjacks, A., Wesche, K., & Hensen I. (2007b). Potential lateral expansion of *Polylepis* forest fragments in central Ecuador. Forest Ecology Management, 242, 477-486
- Condit, R., Hubbell, S. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. Genome, 34, 66-71

- Culley, T., Sbita, S., & Wick, A. (2007). Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the Perennial Herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR markers. Annals of Botany, 27, 83-93
- Dellaporta, S., Wood, J., & Hicks, J. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. Plant Molecular Biology Reporter, 14, 19-21
- Dice, L. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology, 26, 297-302
- Doyle, J.J., & Doyle J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin, 19, 11-15
- Duarte, J., Santos, J., & Melo, L. (2002). AFLPOP: a computer program for simulated and real populations allocation, based on AFLP data. Molecular Ecology Notes, 2, 380-383
- Eckert, K., Samis, E., & Loughheed, C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. Molecular Ecology 17, 1170–1188

Department of Biology, Queen's University, Kingston, Ontario, Canada K7L 3N6

- Ellstrand, N., & Elam D. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics, 24, 217-242
- Enrico, L., Funes, G., & Gabido, M. (2004). Regeneration of *Polylepis australis* Bitt. In the mountains of central Argentina. Forest Ecology and Management, 190, 301-309
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (1996). An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis; Arlequin 3.1
- Excoffier, L., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131, 479-491
- FAO. (2005). Deforestation continues at an alarming rate.
- Ferreira, M., y Grattapaglia. (1995). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: Embrapa.
- Fjeldsa, J. (1991). The activity of birds during snow-storms in high-level woodlands in Perú. Bull. Brit. Orn. Club, 111, 4-11
- Fjeldsa, J. y Kessler, M. (2004). Conservación de la biodiversidad de los bosques de *Polylepis* de las tierras altas de Bolivia. DIVA Technical Report 11.

- Godt, M., & Hamrick, J. (1993). Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). American Journal Botany, 80, 959-966.
- González, J. y Medina, J. (2001). Patología Molecular. Madrid: McGraw-Hill Interamericana.
- Hamilton, L. (1987). Tropical watershed forestry – aiming for greater accuracy. AMBIO, 16, 37-373
- Hanfstingl, U., Berry, A., Kellogg, E., Costa, J., RYdiger, W., & Ausubel, F. (1994) Haplotypic divergence coupled with lack of diversity at the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase locus: roles for both balancing and directional selection?. Genetics, 138, 811-828.
- Hardtke, C., Muller, J., & Berleth, T. (1996). Genetic similarity among *Arabidopsis thaliana* ecotypes estimated by DNA sequence comparison. Plant Molecular Biology, 32, 915-922.
- Harmrick, J., Linhart, Y., & Mitton, J. (1979). Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. Ecology Systemics, 10, 173-200
- Hedberg, O. (1964). Features of afroalpine plant ecology. Acta Phytogeografica Suecica, 49, 1-144

- Hoch, G., & Corner, C. (2005). Growth, demography and carbon relations of *Polylepis* trees at the world's highest treeline. Functional Ecology, 2005
- Iglesias, L., y Casas, J. (2004). Avances en la evaluación de la diversidad genética de especies forestales mediante el uso de marcadores isoenzimáticos. Cuadernos de biodiversidad, 15, 11-16
- IPGRI y Cornell University. (2003). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética en plantas: Módulo de aprendizaje.
- Jaccard, P. (1908). Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles, 44, 223-270.
- Kessler, M. (1995). The genus *Polylepis* (*Rosaceae*) in Bolivia. Candollea, 50, 131-171
- Kessler, M. (2002). The *Polylepis* problem: where do you stand? Ecotropical, 8, 97-110
- Kessler, M., y Driesch, P. (1994). Causas e historia de la destrucción de bosques altoandinos en Bolivia. Ecología en Bolivia, 21, 1-18
- Kessler, M., & Herzog, S. (1998). Conservation status in Bolivia of timberline habitats, elfin forest and their birds. Cotinga, 10, 50-54

- Kessler, M, & Schmidt, A. (2006). Taxonomical and distributional notes on *Polylepis* (Rosaceae). Organisms, Diversity and Evolution, 1, 1-10
- Khanuja, S., Shasany, A., Darokar, M., & Kumar, S. (1999). Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter, 17, 1-7
- Kirsten, D., & Playford J. (1996). DNA Extraction in rainforest species. Bio Techniques, 20, 974-978
- Kojima, T., Nagaoka, T., Noda, K., & Ogihara, Y. (1998). Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. Theoretical Applied Genetics, 96, 37-45
- Krauss, S. (2000). Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. Molecular Ecology, 9, 1241-124
- Kwak, M., Velterop, O., & Andel, J. (1998). Pollen and gene flow in fragmented habitats. Applied Vegetation Science, 1, 37-54.
- Laegaard, S. (1992). Influence of fire in the grass paramo vegetation of Ecuador. Pp. 151-170, in Balslev, H. y J. Luteyn (eds.): *Paramo: An Andean Ecosystem under human influence*. Academic Press. Londres.

- Ledig, F. (1992). Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. Oikos, 63, 87-108
- Legendre, P., & Legendre, L. (2000). Numerical Ecology – Developments in Environmental Modelling. Masson: Quebec
- Legendre, P., & Fortin, M. (1989). Spatial pattern and ecological analysis. Vegetatio 80, 107-138.
- Lehninger, A. (1981). Bioquímica: Las bases moleculares de la estructura y función celular. Pueblo y educación. La Habana.
- Lesica, P., & Allendorf, F. (1995). When are peripheral populations valuable for conseration?. Conservation Biology, 9, 753-760
- Lewin, B. (2001). Genes VII. Marbán: Madrid
- Lindgren, D., Paule, L., Shen, X., Yazdani, R., Segerstrom, U., Willin, J., & Lejdebros, M. (1995). Can viable pollen carry scots pine genes over long distances?. Grana, 34, 64-69
- Lizarzaburo, J. (2002). Filogenia de *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisoibeeae) en el Ecuador mediante PCR-RFLP y posición de Sanguisorbeae en Rosaceae. Quito

- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research, 27, 209-220.
- Mariette, S., Chagne, D., & Lezier, C. (2001). Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations : comparison between AFLP and microsatellite markers. Heredity, 86, 469-479
- McCauley, R., & Ballard, H. (2002). Inferring nativity and biogeographic affinities of central and marginal populations of *Froelichia floridana* (Amaranthaceae) from Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) markers. Journal of the Torrey Botanical Society, 31, 1-325.
- Ministerio de relaciones exteriores del Ecuador. (2005). Medio ambiente y desarrollo sustentable
- Miranda, M., y Condal, A. (2003). Importancia del análisis estadístico exploratorio en el proceso de interpolación espacial: caso de estudio Reserva Forestal Valdivia. Bosque, 24, 29-42
- Morgan, R. (1980). Soil erosion and conservation. Longman: Harlow
- Nagaoka, T., & Ogihara, Y. (1997). Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. Theoretical and applied genetics, 94, 597-602.

- Nason, A. (1976). Biología. Limusa: México
- Nei, M. & Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding of the natural Academy of Science USA, 76, 5269-5273.
- Norusis, M. (1998). SPSS/PC advanced statistics, versión 2.0. [software de computadora en disco]. Chicago: SPSS Inc.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular ecology, 13, 55-65
- Oppenheimer, H. (1960). Adaptation to drought: Xerophytism. Arid Zone Research (UNESCO), 15, 105-138
- Porebski, S., Bayley, G., & Brown, B. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. Plant Molecular Biology Reporter, 15, 8-15
- Prevost, A., & Wilkinson, M. (1999). A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. Theor. Appl. Genet., 98, 107-112
- Pulgar, V. (1967). Geografía del Perú: las ocho regiones naturales del Perú. Lima: Universo

- Qamaruz-Zaman, F., Fay, M., Parker, J., & Chase, M. (1998). The use of AFLP fingerprinting in conservation genetics: a case study of *Orchis simian* (Orchidaceae). Lindleyana, 13, 125-133
- Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. Systematic Biology, 56, 879-886
- Renison, D., Hensen, I., Suarez, R., & Cingolani, A. (2006) Cover and growth habit of *Polylepis* woodlands and shrublands in the mountains of central Argentina: human or environmental influence?. Journal of Biogeography, 33, 876–887
- Rickwood, D., & Homes, B. (1995). PCR. Wiley. Colchester
- Robertson, K. (1974). The genera Rosaceae in Southeastern United States. Journal of the Arnold Arboretum, 55, 303-332
- Rohlf, F. (1998). NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.02h. Setauket, New York: Exeter Software.
- Romoleroux, K. (1996). Rosaceae in Flora of Ecuador. G. Harling and L. Anderson: Copenhagen
- Salgado-Labouriau, M. (1979). Modern pollen deposition in the Venezuelan Andes. Grana, 18, 53-59

- Schiemann, K., Tyler, T., & Widen, B. (2000). Allozyme diversity en relation to geographic distribution and population size in *Lathyrus vernus* (L.) Bernh. (Facaceae). Plant systemic evolution, 225, 119-132
- Scheen, A., Elven, R., & Brochman, C. (2002). A molecular-morphological approach solves taxonomic controversy in arctic *Draba* (Brassicaceae). Can. J. Bot. 80, 59-71
- Schmidt-Lebuhn A. (2005). An assessment of the genetic population structure of two species of *Polylepis* in Chilean Andes. Flora, 201, 317-325
- Schmidt-Lebuhn A., Kessler, M., & Kumar, M. (2006). Promiscuity in the Andes: Species relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) based on AFLP and morphology. Systematic Botany, 31, 547-559
- Segovia, C. (2006). Distribución potencial del yagual (*Polylepis* spp) en los Andes ecuatorianos: una herramienta para su conservación. Congreso de conservación de *Polylepis*.
- Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. Bell System Technical Journal, 27, 379-423
- Shen, J., Ding, X., Liu, D., Ding, G., He, J., Lai, X., Tang, F., & Chu, B. (2006). Intersimple Sequence Repeats (ISSR) molecular fingerprinting markers for authenticating populations of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo. Biological Pharmaceutical Bulletin, 29, 420-422

- Sibley, C., & Ahlquist, J. (1990). Phylogeny and classification of birds. A study in molecular evolution. Yale Univ. Press., New Have-London.
- Simmons, M., Zhang, L., Webb, C., & Muller, K. (2007). A penalty of using anonymous dominant markers (AFLPs, ISSRs and RAPDs) for phylogenetic inference. Molecular Phylogenetics and Evolution, 42, 528-542
- Simpson, B. (1975). Pleistocene changes in the flora of high tropical Andes. Paleobiology, 1, 273-294
- Simpson, B. (1979). A revision of the genus *Polylepis* (Rosaceae: Sanguisorbeae). Smithsonian Contributions to Botany, 43, 1-62.
- Smiet, F. (1987). Tropical watershed forestry under attack. AMBIO, 16, 156-158
- Solomon, E., Berg, L., y Martin, D. (2001). Biología. McGraw-Hill: Méjico
- Sorensen, T. (1948). A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. Bio. Skr., 5, 1-34
- Storz, J. (2005). Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptative populations divergence. Molecular Ecology, 14, 671-688

Surzycki, S. (1999). Basic techniques in molecular biology. Springer. Bloomington

Swati, P., Prabhakar, K., Ranjekar, G., & Vidya S. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. Plant Molecular Biology Group, 411, 6-8

Técnicas avanzadas en biología molecular. Ácidos nucleicos, extracción de ADN y ARN. (2001). Extraído el 22 de Abril del 2008 de: <http://www.upo.es/depa/webdex/biocel/Técnicas/documentos/TAB-8.pdf>

Tosi, J. (1960). Zonas de vida natural en el Perú: Zona árida. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Boletín Técnico, 5, 1-271

Troya, A. (2006). Diversidad genética de poblaciones de *Polylepis incana Kunth* en el centro-norte del Ecuador mediante AFLP's : Una aproximación a su manejo y conservación. Quito

Ullrich, H., LŠttig, K., Brennicke, A., & Knoop, V. (1997) Mitochondrial DNA variations and nuclear RFLPs reflect different genetic similarities among 23 *Arabidopsis thaliana* ecotypes. Plant Molecular Biology, 33, 37-45.

Walter, H., & Medina, E. (1969). La temperatura del suelo como factor determinante para la caracterización de los pisos subalpino y alpino en los Andes de Venezuela. Boletín Venezolana de Ciencias Naturales, 115/116, 201-210

- Whitehead, D. (1969). Wind Pollination in the Angiosperms; Evolutionary and Environmental Considerations. Evolution, 23, 28-35
- Wolfe, A., Xiang, Q., & Kephart, S. (1998). Diploid hybrid speciation in *Penstemon* (Scrophulariaceae). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 94, 5112-5115.
- Yang, W., Oliveira, A., Godwin, I., Schertz, K., & Bennetzen, J. (1996). Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums. Crop Science, 36, 1669-1676.
- Yeh, F., & Layton C.(1979). The organization of genetic variability in central and marginal populations of lodgepole pine *Pinus contorta* spp. latifolia. Genetic Cytology, 21, 487-503.
- Young, A., Boyle, T., & Beown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends in Ecology and Evolution, 11, 413-418