

Estudio de genética poblacional de *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea* en Pichincha mediante la utilización de marcadores moleculares SSRs

Rosa Andrade¹, Mónica Jadán¹ y Claudia Segovia-Salcedo^{1,2}

¹Grupo de Conservación de Bosques de *Polylepis*. Facultad de Biotecnología, ESPE,

Sangolquí, Ecuador roselena2007@hotmail.com

²Department of Biology. University of Florida. Gainesville, Florida. EEUU

claudia@ufl.edu

Recibido: 10, 01, 2013; aceptado: 01, 10, 2013

RESUMEN.- Los bosques de *Polylepis* son centros de biodiversidad con alto impacto antropogénico. En nuestro país no existen estudios de estructura genética en el género, información indispensable para su conservación genética. El presente estudio se centra en dos especies con conflicto taxonómico: *P. pauta* y *P. sericea* en la provincia de Pichincha (Yanacocha, Mojanda y Cayambe-Coca). En total se analizaron 142 individuos de las tres poblaciones. El ADN se extrajo mediante el método CTAB para luego amplificarlo con cinco microsatélites diseñados para este género. Se detectaron 18 alelos compartidos entre las dos especies. El análisis mediante Structure reveló la existencia de dos grupos. El primero conformado por Cayambe-Coca y Mojanda y el otro por Yanacocha. Los valores de heterocigocidad observada (H_o) en Cayambe-Coca, Mojanda y Yanacocha fueron de 0.576 y 0.299. Mientras que la esperada (H_e) fue de 0.605 y 0.524. La mayor diferencia corresponde a Yanacocha y se puede atribuir a la selección a favor de un alelo o endogamia. Mediante análisis de diferenciación se comprobó que ambos grupos son diferentes con $p=0.00072$ ($\alpha=0.05$). AMOVA mostró que la mayor variación corresponde a dentro de las poblaciones (88 %). El análisis de agrupamiento detectó dos grupos: el primero conformado por Cayambe-Coca y Mojanda, y el segundo por Yanacocha. Sin embargo, se detectó un agrupamiento diferente para la subpoblación Mojanda 1 (*P. pauta* x *P. incana*). No se encontró correlación entre distancia genética y distancia geográfica. En este estudio se pudo diferenciar a ambas especies molecularmente, por lo cual se demuestra que los SSRs diseñados fueron marcadores poderosos en análisis de diversidad, diferenciación y estructura en este género.

PALABRAS CLAVES: conservación, genética poblacional, *Polylepis*, SSRs

ABSTRACT.- *Polylepis* forests are one of the most vulnerable centers of Andean diversity that have been affected by anthropogenic impacts. In Ecuador there are no studies of genetic structure in this genus, which is fundamental information for genetic conservation. This study analyzed two species with taxonomic uncertainty, *P. pauta* and *P. sericea*, in three populations: Yanacocha, Mojanda, and Cayambe-Coca National Park. Each population consisted of three subpopulations with a total of 142 individuals. DNA was extracted using the CTAB method and was amplified with 5 SSR primers designed for this genus. Eighteen alleles were detected between the two species. Analysis for genetic structure detected two groups. The first one contained the Cayambe-Coca and Mojanda populations and Yanacocha was in the second group. The observed heterogeneity (H_o) for the Cayambe-Coca and Mojanda population was 0.576, and 0.299 for the Yanacocha population. In contrast, the expected heterogeneity (H_e) was 0.605 and 0.524 for the populations in Cayambe-Coca and Mojanda and Yanacocha. The biggest difference between these statistics was in the Yanacocha population. This could be attributable to one allele selection or inbreeding. Through differentiation analysis it was probed that both population established are different $p=0.00072$ ($\alpha=0.05$). The largest source of variation corresponds to within populations differences (AMOVA). Clustering analysis detected a significant clustering in a subpopulation from Mojanda (Moj1). This may be due to a hybrid origin (*P.pauta* x *P. incana*) of this population. Correlation between genetic and geographic distance was not detected. Through this study it was possible to differentiate both species; therefore, SSRs were powerful markers to detect genetic diversity, differentiation, and population structure in this genus.

KEYWORDS: conservation, *Polylepis*, population genetics, SSRs

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial durante el período de 1990 al 2012, se han reportado las mayores reducciones de áreas de bosques en los trópicos en países en vías de desarrollo (White *et al.*, 2007). Es más, se estima que más del 98 % del bosque primario en el mundo se ha perdido debido a actividades humanas en los últimos 1000 años. Los Andes no son la excepción, en los cuales los bosques de *Polylepis* entre los ecosistemas

más amenazados en el Neotrópico (Gareca *et al.*, 2013). Se estima que la tasa de deforestación en el Ecuador es del 3 % anual; está dentro de los países con el porcentaje más alto de deforestación en Latinoamérica, con pérdidas entre 60 000 a 200 000 hectáreas de bosques nativos, que son resultado de cortes ilegales, expansión de los cultivos, presión por compañías mineras y petroleras (Mecham, 2001).

La fragmentación de estos bosques genera varios cambios, entre ellos la alteración de los patrones de flujo génico, con aumento de la diferenciación entre las poblaciones y por ende una disminución en el éxito reproductivo de los individuos, debido a la endogamia (White *et al.*, 2007; Fjeldsa y Kessler, 1996). En nuestro país se han identificado 7 especies nativas pertenecientes al género *Polylepis*, entre las cuales se encuentran *P. weberbaueri*, *P. pauta*, *P. sericea*, *P. incana*, *P. microphylla*, *P. reticulata* y *P. lanuginosa*; las dos últimas son endémicas de nuestro país (Romoleroux y Pitman, 2004). Los bosques de *Polylepis* proveen numerosos servicios ecológicos que han sido subestimados durante siglos por una falta de conocimiento. Las hojas agrupadas al final de las ramas colectan agua de la neblina típica de los ecosistemas altoandinos. Su fuerte relación con musgos y líquenes ayudan a controlar el flujo del agua. Estos bosques proveen refugio de cientos de plantas y animales muchos de ellos endémicos. A pesar de la importancia de *Polylepis*, en los ecosistemas altoandinos no existen estudios suficientes sobre la estructura genética de sus especies (Gareca *et al.*, 2013). Con la información obtenida en este estudio será posible elaborar proyectos de restauración y de reforestación exitosos que contribuyan a un manejo adecuado y conservación de los bosques de *Polylepis* en el Ecuador.

En este trabajo se pretende examinar la estructura genética de *P. pauta* y *P. sericea*, ambas especies con características morfológicas similares (Segovia-Salcedo *et al.*, 2010; Romoleroux, 1996). Mediante este estudio será posible diferenciarlas molecularmente con el propósito de resolver el conflicto taxonómico de las mismas. Este es el primer trabajo realizado en este género con la utilización de los marcadores microsatélites diseñados para este grupo taxonómico, por lo cual los resultados obtenidos son promisorios para investigaciones futuras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección y conservación del material vegetal.- En la presente investigación, se utilizaron hojas frescas recolectadas en las salidas de campo, así como muestras botánicas. Las hojas fueron colectadas en bolsas plásticas e inmediatamente colocadas en neveras portátiles para evitar la oxidación del material. Se recolectaron muestras de tres poblaciones: Cayambe-Coca, Mojanda y Yanacocha, con un total de 142 individuos en la provincia de Pichincha. Cada población constó de tres subpoblaciones, con un promedio de 15.7 individuos por subpoblación. Ejemplares colectados en cada una de las poblaciones se encuentran depositados en el Herbario Nacional (QCNE) (Tabla 1).

Tabla 1
Descripción de las muestras de *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea* recolectados para el presente estudio

Población	Especie	Ubicación Geográfica (UTM) y elevación	Número de Individuos Colectados
CayCoca1		Parque Nacional Cayambe Coca 17 819052 9966764 3 980 msnm	12
CayCoca2	<i>P. pauta</i> - <i>P. sericea</i>	Parque Nacional Cayambe Coca 17 819466 9975197 3 912 msnm	17
CayCoca3		Parque Nacional Cayambe Coca 17 818792 9979339 3 700 msnm	12
Yan1		Reserva Privada Yanacocha 17 768313 9986267 3 539 msnm	19
Yan2	<i>P. sericea</i>	Reserva Privada Yanacocha 17 768697 9985884 3 820 msnm	18
Yan 3		Reserva Privada Yanacocha 17 768662 9985191 3 831 msnm	18
Moj1	<i>P. pauta</i> X <i>P. incana</i>	Lagunas de Mojanda 17 805732 15302 3 775 msnm	17
Moj2	<i>P. pauta</i>	Lagunas de Mojanda 17 804306 13454 3 850 msnm	13
Moj3	<i>P. pauta</i>	Lagunas de Mojanda 17 803099 16624 3 722 msnm	16

Los individuos (árboles) en los muestreos fueron seleccionados al azar, además se tomó una distancia mínima de 10 m entre individuos para asegurar que se estaban recolectando individuos diferentes. En todas las salidas de campo se georeferenciaron los puntos de colección

(GPS), con los cuales se elaboraron mapas de distribución mediante el programa MapSource 6.13.7 y GPS Visualizer 2012. Las poblaciones muestreadas corresponden a tres sectores: Cayambe-Coca, Mojanda y Yanacocha de la provincia de Pichincha (Figura 1).



Figura 1. Genética poblacional *Polylepis pauta* y *Polylepis sericea* en Pichincha mediante SSRs. Mapa de distribución de las muestras recolectadas de *P. pauta* y *P. sericea*. Reserva Cayambe Coca (círculos rojos), Fundación Conservación Jocotoco, Yanacocha (círculos verdes), Mojanda (círculos azules). Mapa elaborado mediante MapSource y GPS Visualizer.

La distancia en línea recta entre las poblaciones de Yanacocha y Mojanda es de 44.4 km, la distancia entre Mojanda y Cayambe-Coca es de 47.9 km y entre Cayambe-Coca y Yanacocha es de 51 km. Las poblaciones de Yanacocha se encuentran en la cordillera Occidental, mientras que las de Cayambe-Coca y de Mojanda se encuentran en la cordillera Oriental.

Extracción y cuantificación de ADN genómico.- La extracción de ADN genómico en tejidos vegetales implica: remoción de las membranas que cubren el ADN, separación del ADN de otros componentes celulares y el mantenimiento de la integridad del ADN durante el proceso. Para la extracción de ADN se probaron 4 protocolos: Doyle y Doyle,

1987; Porebski *et al.*, 1997; Khanuja *et al.*, 1999 y un protocolo modificado de CTAB. De acuerdo con los resultados obtenidos la extracción de ADN con mayor cantidad

y calidad en estas muestras de *Polylepis* se llevó a cabo mediante el protocolo de CTAB modificado (Figura 2).

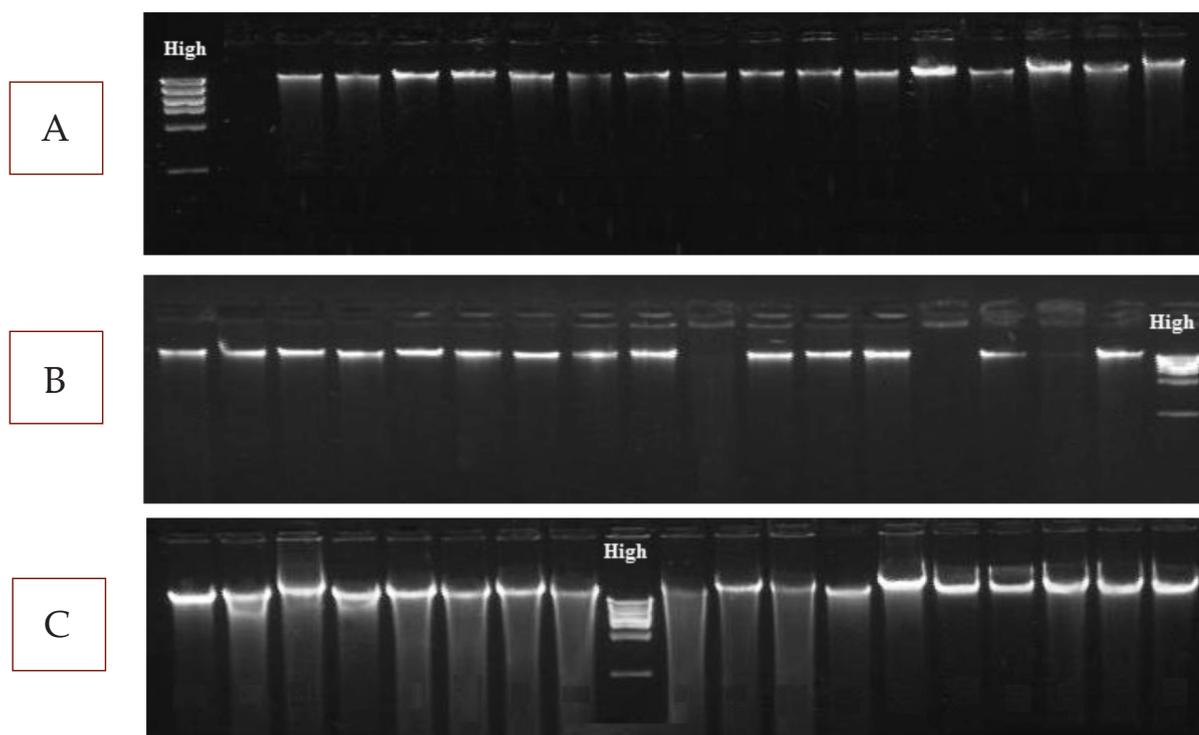


Figura 2. Electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % teñido con Sybr Safe (0.035 ng/ml de gel) para la verificación de la calidad de ADN de las poblaciones de *Polylepis*. A) Cayambe Coca, B) Mojanda C) Yanacocha. High: Marcador de alto peso molecular.

Para este protocolo, primero se congelaron tanto los morteros como los pistilos a -20° C. Después se colocó en ellos la muestra (5 g) y se la maceró con nitrógeno líquido, hasta obtener una muestra pulverizada. Este macerado se lo almacenó en tubos Falcon de 15 ml en el congelador de -80° C hasta su posterior uso. Para la extracción de ADN se pesaron aproximadamente 200 mg del macerado anterior en microtubos de 2 ml y se los mantuvo en nitrógeno hasta colocar el

tampón de extracción. Al momento de la extracción se añadió en el tampón de extracción (CTAB 2 %, EDTA 0.25 M, NaCl 5 M y Tris-HCl 1 M (pH 8) los antioxidantes (PVP 2 % y $15 \mu\text{l}$ β -Mercaptoetanol). En cada microtubo de 2 ml se colocaron $800 \mu\text{l}$ de este tampón y fueron mezclados mediante pistilos y con vórtex hasta obtener una solución homogénea. Luego, se colocaron $400 \mu\text{l}$ más de tampón hasta que se obtuvo una muestra completamente disuelta en el tampón de extracción. A esta solución se

la incubó a 65° C durante una hora. Una vez enfriados los tubos, se añadieron en la sorbona 800 µl de CIA (24:1). Después, se agitó vigorosamente en el vórtex, hasta obtener una emulsión blanquecina. A esta emulsión se la centrifugó a 14500 rpm por 10 minutos. Y se traspasó el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml sin topar la interfase presente. Luego, se añadieron 700 µl de isopropanol a -20° C y se guardaron los tubos a -20° C durante 2 horas. En caso de no visualizarse el precipitado de ADN se incubó por 1-2 horas más en -20° C. Después, se centrifugaron los tubos por 15 minutos a 14 500 rpm y el sobrenadante obtenido se lo descartó. Luego, se realizaron dos lavados del precipitado con 300 µl de etanol al 70 % a -20° C. Una vez realizados estos dos lavados se realizó un lavado final con 200 µl de etanol puro. Todos los lavados se los realizó en un termobloque a 300 rpm por 5 minutos, seguido de 3 min de centrifugación rápida. Una vez concluidos los lavados se evaporaron los restos del alcohol presente, de preferencia esto se lo realizó en una sorbona por unos 30 minutos. Después, se resuspendió este *pellet*, para incubarlo a 37° C con 100 µl de tampón TE y 3 µl de RNAasa por una hora o hasta que se observó la completa disolución del mismo. Una vez disuelto el ADN se lo almacenó durante una media hora a 4° C y después se realizaron alícuotas a 20 ng/µl. Estas alícuotas se almacenaron a 4° C y el resto en el congelador de -80° C.

La calidad y cantidad de ADN extraído se la evaluó mediante fluorometría con el uso de Quant-iT dsDNA BR Assay,

INVITROGEN® y con geles de agarosa al 0.8 % teñidos con Sybr Safe (0.035 µl/ml de gel). En la corrida se incluyeron 2 µl de un marcador de peso, High DNA Mass Ladder INVITROGEN®, a un voltaje constante de 120 V por una hora. La visualización de esta corrida electroforética se la realizó mediante un transiluminador de luz UV, VILBER LOURMAT TFX- 20.M y el almacenamiento se lo realizó en el equipo Bio-DocIT System.

Amplificación de secuencias microsatélites.- Los *primers* específicos para la amplificación de los microsatélites utilizados en este estudio, fueron diseñados en el laboratorio de Sistemática Molecular y Genética Evolutiva de la Universidad de Florida a partir de una biblioteca genómica de *P. racemosa* (datos no publicados). Se analizaron 32 *primers* para microsatélites. Para la validación de estos *primers* se procedió primero con una TD-PCR (*Touchdown* PCR), para verificar la amplificación. Las condiciones de temperatura y de tiempo para la amplificación fueron: 3 minutos a 94° C, 35 ciclos (30 segundos a 94° C, 45 segundos en (46, 48, 50 y 52° C), 30 segundos a 72° C), finalmente una extensión de 20 minutos a 72° C. El volumen de reacción final fue de 10 µl, mediante concentraciones 1X Tampón, 1.5 mM MgCl₂, 0.05 mM de dNTPs, 0.45 µM de primer Forward, 0,45 µM de primer Reverse, 1.8 U/µl de Taq polimerasa y para completar la reacción 6.24 µl de agua PCR.

Se utilizaron cinco *sets* de *primers*: 2F-2Ra, 2F-2Rb, 13F-13R, 17F-17Ra y

20F-20R (Tabla 2), que fueron seleccionados por brindar los datos más polimórficos en cada población.

El primer paso fue la búsqueda de controles positivos adecuados en base a los alelos presentes en la población.

Tabla 2
Sets de *Primers* empleados con su respectiva secuencia

<i>Primer</i>	Secuencia del primer	T alineamiento
2F	CACGACGTTGTAAAACGACATAGAAGCCCTGACTCTAAC	50° C
2Ra	TCTGAGACACTGAGGAATAC	
2F	CACGACGTTGTAAAACGACATAGAAGCCCTGACTCTAAC	50° C
2Rb	TGTCATTGCTAAATCACTTC	
13F	CACGACGTTGTAAAACGACCTCCATAAATCATGAGACTG	52° C
13R	TGTCATCGAGACCATTAC	
17F	CACGACGTTGTAAAACGACCTCCATAAATCATGAGACTG	50° C
17Ra	CGAGACCATTACATTGC	
20F	CACGACGTTGTAAAACGACCTTGGTAGTGAAATTTGAAG	52° C
20R	TGGAGTTGTAATGGTATCC	

Después con estos controles se realizaron dupletas de todas las muestras. En todas las validaciones se incluyeron controles negativos y el marcador de peso molecular Track-It 100 bp DNA Ladder de INVITROGEN®. Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 % a 100 V por una

hora. Los geles fueron visualizados bajo luz UV y se fotodocumentaron para seleccionar los mejores patrones de los alelos en las poblaciones de estudio.

Análisis de datos.- Los datos fueron registrados en una matriz de Microsoft Office Excel 2007, en base al ingreso de

información de marcadores codominantes exigido por GenAlEx v6.4. En el presente estudio se analizaron la diversidad, diferenciación y estructura genética para cada grupo de muestras con los 5 *sets* de *primers* microsatélites seleccionados.

La asignación de los individuos a grupos, se la realizó mediante Structure v6.4 (Pritchard *et al.*, 2000), si se toma en cuenta el modelo de “*admixture*” junto con frecuencias correlacionadas como lo sugieren Falush *et al.*, 2007 en casos de una sutil estructura poblacional. Se determinaron valores de *burning length* de 10 000 y un largo de cadena de 100 000 con un valor de $\alpha=0.0607$. Luego se definió al valor K según la técnica de Evanno *et al.*, 2005, con lo cual se obtuvo una probabilidad de la existencia de tres poblaciones. Con este valor, se calculó Q (proporción de cada individuo en k poblaciones) y estos datos se transfirieron a *Distrupt* para su visualización y posterior análisis.

Una vez establecido el número de poblaciones de acuerdo con la estructura genética, se prosiguió con los análisis de diversidad y diferenciación genética. Se calcularon frecuencia de alelos, heterocigosidad esperada y observada (He-Ho), coeficiente de endogamia, equilibrio de Hardy-Weinberg, distancia genética de Nei y análisis de agrupamientos. Los valores de He y Ho se los obtuvo a partir de la inferencia del equilibrio de Hardy-Weinberg mediante el programa ARLEQUIN 3.5 con 1 000 000 de iteraciones para la cadena de Markov y con 1 000 pasos de “*dememorization*”. Una

vez analizados los valores de He y Ho, para cada una de las poblaciones, se realizó la prueba de X^2 con el objetivo de probar si los genotipos observados son consistentes con los esperados bajo apareamiento al azar con $\alpha=0.05$ %.

La diferenciación genética se la calculó mediante la comparación de pares de poblaciones, a través de la estadística F de Wrights. Este análisis se lo realizó en Arlequin 3.5, ya que este programa permite evaluar la hipótesis nula mediante los valores p. Para ello se utilizó la función de “*Compute Pairwise Differences*” mediante la opción de “*Compute a distance matrix*”. Después se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), para conocer en donde se encuentra la mayor variabilidad. La matriz de distancia genética se la elaboró mediante GenAlEx v6.4 a través de la opción de *Codom Genotypic*, que proporciona una matriz de distancias genéticas individuo por individuo (N x N) (Peakall y Smouse, 2006). Una vez elaborada la matriz de distancia genética se procedió a calcular la distancia genética de Nei.

Los análisis de agrupamiento se los realizó mediante el programa Mega v5.0 de Tamura *et al.*, 2011. Se especificó el tipo de dato “*DataType=distance*” y la forma de la matriz triangular de las distancias genéticas “*DataFormat=lowerleft*”. Para determinar si existía o no correlación entre la composición genética y la localización geográfica se aplicó el test de Mantel. Para ello se utilizaron los datos obtenidos del GPS y la matriz de distancia genética de

Nei elaborada mediante GenALEx v6.4. Las distancias geográficas se las realizó con $\log(1+x)$, esto para poder visualizar mejor la correlación entre ambas matrices. La relación entre ambas matrices para el test de Mantel se la elaboró con XLSTAT 2012, mediante la opción de pruebas de correlación/asociación.

RESULTADOS

Mediante análisis en Structure v6.4, se pudo determinar una estructura genética de dos poblaciones. Los resultados indican que tanto las poblaciones de Cayambe-Coca como las de Mojanda comparten un mismo patrón, mientras que la población de Yanacocha muestra otro (Figura 3).

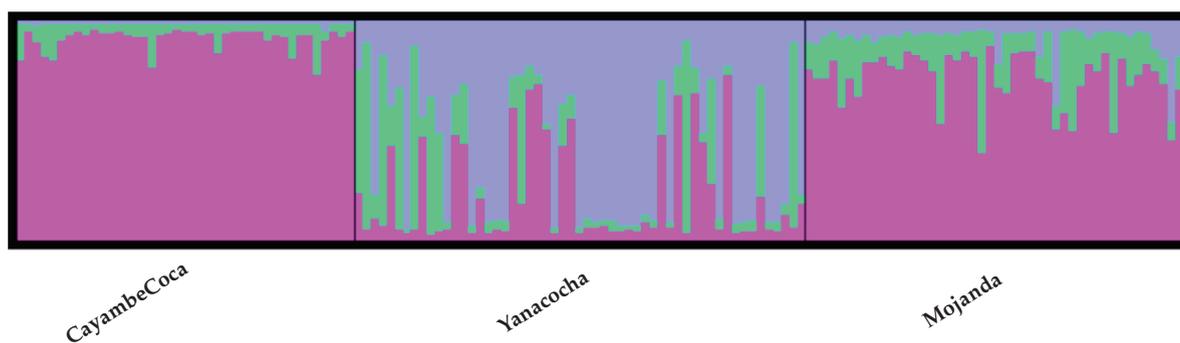


Figura 3. Representación de Q mediante gráfico de barras en Distruct. Cada individuo se representa en una línea vertical, dividida en los tres conglomerados definidos. La población Cayambe-Coca es púrpura, Mojanda es verde y Yanacocha es azulado.

En la Figura 4 se muestran los 18 alelos para los 142 individuos con los 5 loci registrados con sus respectivas frecuencias

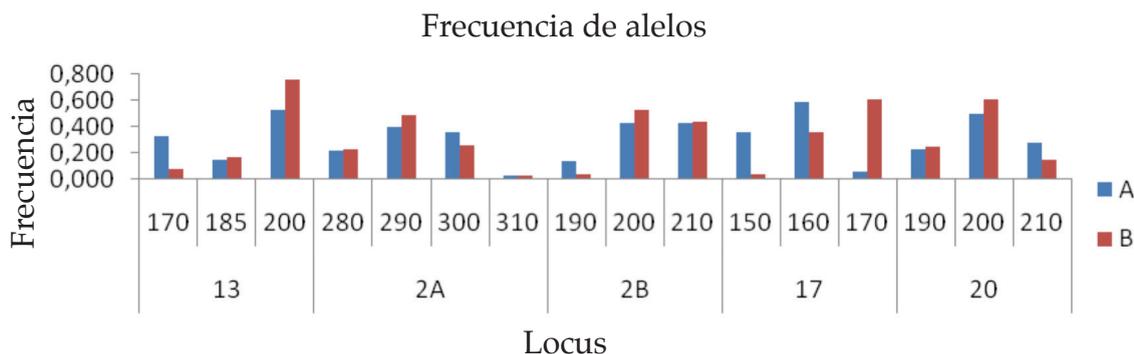


Figura 4. Frecuencia de alelos en los cinco loci para las tres poblaciones. A=Cayambe-Coca y Mojanda, B=Yanacocha.

Los valores obtenidos de heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) e índices de fijación para las tres poblaciones se resumen en la Tabla 3.

mayor diferencia entre He y Ho se da en la población de Yanacochoa. Igualmente, la mayor diferencia en el índice de fijación es atribuible a Yanacochoa, lo cual indica que existe la probabilidad de endogamia en esta población.

Los resultados muestran que la

Tabla 3

Valores de Heterocigosidad observada (Ho), Heterocigosidad esperada (He) e índice de fijación (F) para las dos poblaciones

Población	Ho	He	F
Cayambe-Coca yMojanda	0.576	0.605	0.054
Yanacochoa	0.299	0.524	0.462

El análisis de diferenciación FST en los pares de poblaciones a través de valores p, con 100 000 permutaciones y un nivel de significancia ($\alpha=0,05$) mostró que las dos

poblaciones son significativamente diferentes ($p=0.00072$). El análisis de AMOVA mostró que la mayor variación se atribuye a nivel individual con casi el 90 % (Tabla 4).

Tabla 4

Análisis de varianza molecular (AMOVA). Considerando 2 poblaciones (Yanacochoa y Cayambe Coca-Mojanda) y 3 subpoblaciones por población

Fuente de variación	Grado de libertad	Suma de cuadrados	Varianza	% de variación
Entre las poblaciones	1	20 659	0.12678	8.16
Entre las subpoblaciones	7	23 810	0.05864	3.77
Individuos en la subpoblación	133	209 901	0.20987	13.51
Individuos en la población	142	164 500	1.15845	74.56
Total	283	418 870	1.55375	

El dendograma mediante UPGMA (elaborado con el uso de la distancia genética de Nei), mostró dos grupos principales: primero Cayambe-Coca, Mojanda y en

otro extremo a Yanacocha. Sin embargo, se muestra separada la subpoblación Mojanda 1 (Figura 5).

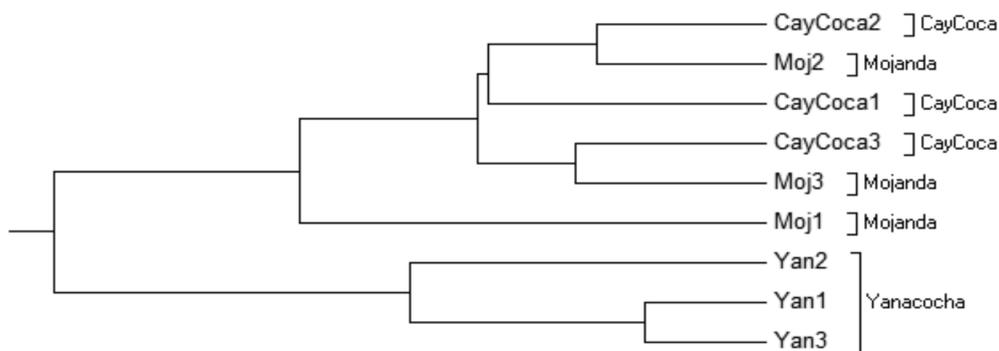


Figura 5. Dendograma derivado de análisis de 5 SSR polimórficos mediante UPGMA, basado en la distancia genética de Nei.

Esta población, debido a indicios de variaciones morfológicas ha sido reportada ya como híbrida (*P. pauta* x *P. incana*) (Romoleroux, 1996).

También dentro de los análisis de estructura genética se incluyó el Test de

Mantel. El valor calculado en esta prueba es mayor que el nivel de significancia $\alpha=0.05$ (0.233), por lo tanto no se puede rechazar la hipótesis nula. Es decir, que no existe correlación entre la matriz de distancia genética de Nei y la de distancia geográfica, donde $R^2= 0.0199$ (Figura 6).

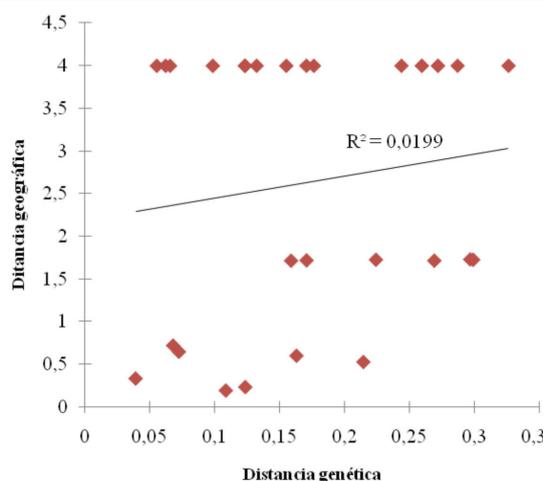


Figura 6. Representación gráfica del test de Mantel, distancia geográfica versus distancia genética de Nei.

DISCUSIÓN

Al ser esta una primera investigación en el género *Polylepis* con microsatélites, los resultados son bastante promisorios. Los resultados indican que Cayambe-Coca y Mojanda (a excepción de Mojanda 1) corresponderían a una población, de acuerdo con estudios previos taxonómicos y revisión de muestras de herbario, pertenecen a la especie *P. pauta*, mientras que la población de Yanacocha correspondería a otra (*P. sericea*). Por lo cual el objetivo principal de poder discriminar dos especies morfológicamente ambiguas, se cumplió a cabalidad.

En cuanto a la metodología empleada, en primer lugar, el método de extracción de ADN descrito fue apropiado para la amplificación de secuencias microsatélites. En este género se han reportado varios métodos de extracción de ADN mediante kits comerciales (Julio *et al.*, 2011; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006; Kerr, 2004). Además, en el 2011, Hensen *et al.* reportan un protocolo de extracción en base a CTAB modificado para el estudio de AFLPs. El presente trabajo probó todos estos métodos; sin embargo, dado el número de muestras a tratarse y la cantidad de reactivos a emplear, se optó por utilizar el protocolo de CTAB al 2 % con las modificaciones descritas en materiales y métodos. Este protocolo mostró los mejores resultados tanto en calidad como en costo. Las altas concentraciones de ADN obtenidas mediante este protocolo se atribuyen a varios factores como: alta concentración de antioxidantes (PVP y β -mercaptoetanol), amplia superficie de contacto entre la muestra y tampón de extracción (mezcla

mediante pistilos), precipitación mediante isopropanol y los lavados con etanol, por lo cual se sugiere que en ensayos con muchos individuos (≥ 100), se use este protocolo ya que es una forma rápida y económica de extraer ADN de alta concentración a partir de material vegetal fresco.

En este género se ha reportado el uso de marcadores del tipo ITS y marcadores cloroplastídicos (Kerr, 2004), AFLPs (Hensen *et al.*, 2011; Schmidt-Lebuhn *et al.*, 2006), RAPD e ISSR (Julio *et al.*, 2008; Ochoa *et al.*, 2008) y marcadores bioquímicos como las aloenzimas (Aragundi *et al.*, 2011). Este es el primer estudio en *Polylepis* en el cual se utilizan microsatélites para estudios de diversidad genética y estructura poblacional. Al trabajar con un marcador de tipo codominante, se tiene la ventaja de poder usar menos microsatélites; se conoce que para tener inferencias similares, se debe emplear al menos cuatro veces más individuos por *locus* en un marcador dominante que con un codominante. Es más, cuando las tasas de migración son altas y la heterogeneidad en el genoma es baja, se sugiere incluso el uso de 10 veces más individuos por *locus* (Lynch y Milligan, 1994). Por lo tanto, el uso de SSRs en *Polylepis* puede brindar estimados genéticos similares con menor número de secuencias. Los cinco *sets* de *primers* aquí utilizados (2F-2Ra, 2F-2Rb, 13F-13R, 17F-17Ra y 20F-20R) fueron seleccionados de acuerdo con el número de productos amplificados, calidad en los perfiles de amplificación, nivel de polimorfismo y reproducibilidad. Sin embargo, es

importante notar que este es un ensayo piloto. Se logra diferenciar estas dos especies, pero estimaciones genéticas más finas deberán realizarse con un mayor número de muestras y más secuencias de microsatélites.

En el presente estudio se detectó que solamente las poblaciones de Yanacocha presentaron una diferencia significativa entre la heterocigosidad observada y esperada. Según el equilibrio de Hardy-Weinberg, se espera una mayor cantidad de heterocigotos de los observados. Este déficit de heterocigotos se puede explicar por la selección a favor o en contra de un alelo, mediante la endogamia o por la falla de amplificación (Selkoe y Toonen, 2006; Nybom, 2004). En las poblaciones de *P. sericea* de la localidad Yanacocha, se detectó una heterocigosidad observada de 0.3. Este valor es cercano al reportado por Julio *et al.*, 2008 ($H_o=0.258$), en donde explica que este dato es común en plantas con características similares de vida a *Polylepis* (polinización cruzada, anemófilas y un alto número de cromosomas). En el caso de la heterocigosidad esperada se detectó el valor de 0.576 en la población Cayambe-Coca, Mojanda. Este valor discrepa con los estudios de Hensen *et al.* 2011 realizado mediante AFLPs en especies ecuatorianas de *P. pauta* ($H_e = 0.164-0.273$).

Estas diferencias se pueden deber al tipo de marcador molecular empleado. En los SSR (codominante) se espera un valor mayor de diversidad ya que los errores en la replicación son más frecuentes que las

mutaciones de un solo nucleótido o eventos de inserción o delección, que generan los polimorfismos detectables mediante otros marcadores como los AFLPs (dominantes) (Powell *et al.*, 1996).

La diversidad genética presente dentro y entre las poblaciones surge, de un balance entre la deriva génica, la endogamia, la recombinación, el flujo génico, la mutación y la selección. Este balance es afectado tanto por factores naturales como antropogénicos (Loveless y Hamrick, 1984). En el presente estudio, luego de calcular las heterocigosidades observada y esperada dentro de las poblaciones de Yanacocha ($H_o=0.3$, $H_e=0.52$), Cayambe-Coca, Mojanda ($H_o=0.58$, $H_e=0.61$) se determinó que la mayor diferencia en base a X^2 corresponde a Yanacocha.

Por lo tanto, se puede considerar que las poblaciones de Cayambe-Coca y Mojanda tienen un comportamiento de reproducción al azar, mientras que las poblaciones de Yanacocha no lo tienen. En la presente investigación se observó que la población de Yanacocha se limita un solo bosque continuo. Por el contrario, las poblaciones de Mojanda y Cayambe-Coca tienen una mayor área geográfica, que a pesar de mostrar fragmentación de hábitat, puede darse flujo génico entre sus diversos parches. Por lo tanto, la falta de variabilidad de Yanacocha se puede atribuir a un proceso de endogamia dentro de esta población. Es necesario evaluar en otras regiones del país, la genética de *P. sericea* para plantear acciones de conservación en esta especie.

Los valores de diferenciación genética reportados en el presente estudio se obtuvieron mediante $F'st$ calculados a partir de AMOVA, prueba con la cual se obtiene una matriz de distancias euclidianas. Esta medida es la más apropiada para determinar la influencia de los procesos demográficos como deriva genética y migración en la estructura genética poblacional (Meirmans y Hedrick, 2011). Sin embargo, es importante considerar que las tasas de migración calculadas mediante Fst , presentan problemas de equilibrio. Esto se debe al modelo usado (isla), que implica supuestos tales como: migración no espacial, tamaños de poblaciones iguales y ausencia de selección. En este trabajo las dos poblaciones descritas (Cayambe-Coca y Mojanda, Yanacocha) son diferentes entre sí. Cayambe-Coca, Mojanda y Yanacocha, se encuentran en lados diferentes de la Cordillera de Los Andes lo cual evitaría el flujo génico a través de polen entre ellas.

La mayor variabilidad detectada se atribuyó a los individuos dentro de cada una de las poblaciones (cerca 90 %) de toda la variación. Una alta variabilidad en los individuos es consistente con una fragmentación reciente de hábitat que además es común en especies ampliamente dispersas, perennes, con polinización cruzada, anemófilas y un alto número de cromosomas (Hamrick *et al.*, 1979). Por lo cual se podría hipotetizar que la visualización en parches de estos bosques no es su estado natural, sino más bien a efectos de tipo antropogénico. Este porcentaje de variabilidad en los individuos

ha sido reportado también por Aragundi *et al.*, (2011) en poblaciones de *P. pauta*, en estudios de *P. australis* por Hensen *et al.*, (2011) y en estudios mediante AFLPs en *P. besseri* (Gareca *et al.*, 2013).

El análisis de agrupamiento mediante UPGMA, muestra dos poblaciones. Están claramente diferenciadas las poblaciones Cayambe-Coca y Mojanda de Yanacocha. Además, se logra observar que Mojanda 1 (población híbrida) se agrupa en otro conjunto. Los resultados de este análisis permiten considerar a los individuos exclusivos de Yanacocha como *P. sericea*. En cambio, a *P. pauta* como exclusivo de Cayambe-Coca y Mojanda. Sin embargo, se necesita extender esta investigación a poblaciones más distantes en el Ecuador, para confirmar estos resultados.

En este estudio no se detectó correlación entre distancia genética y distancia geográfica, lo cual sugiere que las poblaciones de estudio (Cayambe-Coca, Yanacocha y Mojanda) no se conforman con un patrón de aislamiento por distancia. Estos resultados son comunes en el género *Polylepis*, donde individuos de diferentes poblaciones tienen mayor similitud que los individuos en la misma población (Aragundi *et al.*, 2011; Ochoa *et al.*, 2008). Los resultados en este estudio indican que al menos en las poblaciones estudiadas no existe evidencia de aislamiento por distancia, lo cual se explica por un alto flujo génico entre las poblaciones. En especial, en las poblaciones de Cayambe-Coca y Mojanda. Finalmente, al analizar los resultados de esta investigación se puede concluir que los marcadores

moleculares SSRs fueron útiles para detectar diversidad, diferenciación y estructura génica en el género *Polylepis*. Se determinó que las muestras del Parque Nacional Cayambe-Coca y Mojanda son consistentes con una sola especie: *P. pauta*. Mientras que las muestras de Yanacocha pertenecen a *P. sericea*. Sin embargo, se necesitan estudios más amplios para poder realizar planes de restauración y conservación en estos bosques.

CONCLUSIONES

- El método de extracción empleado (CTAB al 2 % modificado) fue óptimo para la extracción de ADN de *Polylepis*, ya que permitió la obtención de una concentración de ADN superior a 50 ng / μ l. Es importante mencionar que la extracción debe realizarse en muestra fresca y recién colectada debido a que las muestras tienden a oxidarse fácilmente, por lo cual, mantener la cadena de frío hasta la incubación de las muestras es muy importante.

- Se lograron seleccionar 5 sets de primers para microsatélites a partir de técnicas de PCR tales como TD-PCR y PCR en gradiente, los cuales brindaron gran cantidad de información, buena calidad de datos y disminución de errores de puntuación para los análisis de diversidad, diferenciación y estructura para las poblaciones de *Polylepis* reportadas. Se sugiere que se incluyan, en futuros estudios, ensayos de secuenciación para poder verificar los resultados obtenidos, así como comprobar la ausencia de efectos homoplásicos.

- Los análisis de diversidad genética muestran que las poblaciones de Cayambe-Coca y Mojanda tienen un comportamiento de reproducción al azar, así como una poca diferenciación genética. Por el contrario, las poblaciones de Yanacocha no presentaron este tipo de reproducción. Para poder conocer el impacto de la fragmentación y degradación del hábitat en este género, se sugiere comparar las diferentes subpoblaciones dentro de bosques continuos y remanentes de *Polylepis* con árboles de diferentes edades para poder caracterizar directamente la paternidad, patrones de cruces y eventos de flujo génico.

- Finalmente, los microsatélites SSRs fueron útiles para análisis previos de diversidad, diferenciación y estructura génica en el género *Polylepis*, ya que se pudo determinar dos grupos altamente diferenciados. El primero conformado por las poblaciones de Cayambe-Coca y Mojanda, donde se considera a la especie *P. pauta* como individuos exclusivos y el segundo por las poblaciones de Yanacocha con *P. sericea*. Se recomienda correlacionar los análisis genéticos aquí reportados con los citogenéticos en las poblaciones analizadas, para afinar los resultados de diversidad obtenidos. También sería adecuado extender el estudio con otras especies dentro del género de *Polylepis* y otros marcadores codominantes para realizar análisis de filogenia y de filogeografía más completos de este género.

AGRADECIMIENTOS

Un agradecimiento a los laboratorios de Biotecnología vegetal y Cultivo de Tejidos de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología y a los profesionales colaboradores: Dra. Karina Proaño e Ing. Paola Párraga (Escuela Politécnica del Ejército - Departamento de Ciencias de la Vida). Así mismo un agradecimiento al Ministerio del Ambiente, Dirección Nacional de Pichincha, por el permiso de investigación otorgado para el Parque Nacional Cayambe-Coca (N° 048-2011-IC-FLO-DPAP-MA) y a la Fundación Jocotoco por la autorización para coleccionar muestras en su reserva Yanacocha.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aragundi S, Hamrick J y Parker K. 2011. Genetic insights into the historical distribution of *Polylepis pauta* (Rosaceae) in the northeastern Cordillera Oriental of Ecuador. *Conservation Genetics*, **12**: 607-618.
- Doyle J J y Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, **19**: 11-15.
- Evanno G, Regnaut S y Goudet J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611-2620.
- Falush D, Stephens M y Pritchard J. 2007. Inference of population structure using *multilocus* genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**: 574-578.
- Fjeldsa J y Kessler M. 1996. *Conserving the biological diversity of Polylepis woodlands of the highland of Peru and Bolivia. A Contribution to Sustainable Natural Resource Management in the Andes*. Nordeco. Dinamarca.
- Gareca E, Breyne P, Vandepitte K, Chaill J, Fernandez M y Honnay O. 2013. Genetic diversity of Andean *Polylepis* (Rosaceae) woodlands and inferences regarding their fragmentation history. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **172**: 544-554.
- Hamrick J, Linhart Y y Mitton J. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **10**: 173-200.
- Hensen I, Teich I, Hirsch H, Wehrden H y Renison D. 2011. Range-wide genetic structure and diversity of the endemic tree line species *Polylepis australis* (Rosaceae) in Argentina. *American Journal of Botany*, **98**: 1825-1833.
- Julio N, Dueñas J, Reninson D y Hensen I. 2011. Genetic Structure and diversity of *Polylepis australis* (Rosaceae) tree populations from central Argentina: Implications for forest conservation. *Silvae Genetica*, **60**: 55-56.

- Julio N, Sobral A, Dueñas J, Di Rienzo J, Renison D y Hensen I. 2008. RAPD and ISSR markers indicate diminished gene flow due to recent fragmentation of *Polylepis australis* woodlands in central Argentina. *Biochemical Systematics and Ecology*, **36**: 329–335.
- Kerr M. 2004. A phylogenetic and biogeographic analysis of *Sanguisorbeae* (Rosaceae) with emphasis on the Pleistocene radiation of the high Andean genus *Polylepis*. *Tesis de Doctorado*, University of Maryland.
- Khanuja S, Shasany A, Darokar M y 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.
- Lynch M y Milligan B. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, **3**: 91–99.
- Loveless M, y Hamrick J. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **15**: 65–95.
- Mecham J. 2001. *Causes and consequences of deforestation in Ecuador*. Centro de Investigación de los Bosques Tropicales (CIBT). Página de Internet: www.rainforestinfo.org.au/projects/jefferson.htm. Consultada: diciembre-2012.
- Meirmans P y Hedrick P. 2011. Assessing population structure: F_{st} and related measures. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 5–18.
- Nybom H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, **13**: 1143–1155.
- Ochoa V, Proaño K y Jiménez P. 2008. Genética poblacional de dos especies de plantas leñosas del páramo ecuatoriano con miras a un proceso de rehabilitación. *Tesis de pregrado*, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador.
- Peakall R y Smouse P E. 2006. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, **6**(1): 288–295.
- Porebski S, Bailey L y Baum B. 1997. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharides and polyphenol component. *Plant Molecular Biology Reporter*, **15**: 8–15.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S y Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*, **2**: 225–238.
- Pritchard J, Stephens M y Donnelly P. 2000. Inference of population structure using *multilocus* genotype

- data. *Genetics*, **155**: 945–959.
- Romoleroux K y Pitman N. 2004. IUCN Red List of Threatened Species. Página de Internet: <http://www.iucnredlist.org/details/38119/0>. Consultada 15-julio-2012.
- Romoleroux K. 1996. *Rosaceae-Flora of Ecuador*. Denmark: Herbario, Departamento de Biología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Segovia C, Quijia P, Proaño K, Soltis P y Soltis D. 2010. La Desaparición de los Bosques de *Polylepis* (Rosaceae: Rosoideae: Sanguisorbeae) en el Ecuador: Hibridización y las implicaciones para su manejo y conservación. *Ecociencia*. Quito.
- Schmidt-Lebuhn A, Kessler M y Kumar M. 2006. Promiscuity in the Andes: Species Relationships in *Polylepis* (Rosaceae, Sanguisorbeae) Based on AFLP and Morphology. *Systematic Botany*, **31**: 547–559.
- Selkoe K y Toonen R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, **9**: 615–629.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M y Kumar S. 2011. Mega5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using likelihood, distance and parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731–2739.
- White T, Adams T y Neale D. 2007. *Forest Genetics*. Primera edición. CAB International. Massachusetts. 682 pp.