

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Estudio preliminar de la diversidad genética de la guayaba, *Psidium guajava*, en 6 localidades de la isla San Cristóbal, Ecuador

MARÍA JOSÉ PONCE ANDRADE

María de Lourdes Torres, PhD, Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Licenciada en
Biotecnología

Quito, junio 2014

Universidad San Francisco de Quito

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

**Estudio Preliminar de la Diversidad Genética de la Guayaba (*Psidium guajava*) en
6 localidades agrícolas de la isla San Cristóbal, Ecuador Mediante el Uso de
Marcadores Moleculares Microsatélites**

María José Ponce Andrade

María de Lourdes Torres, Ph.D,

Directora de tesis y

Miembro del Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D

Miembro del Comité de Tesis

Hugo Valdebenito, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decana del Colegio de Ciencias

Biológicas y Ambientales

Quito, junio del 2014

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Nombre: María José Ponce Andrade

C. I.: 1716045891

Fecha: 20 de Mayo, 2014

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi mejor amiga, la única e incondicional que durante este trabajo me enseñó a cosechar los frutos de difíciles sembríos, mi mamá. A mis hermanas, mis amigas del ama, Vi y Paz. Al hombre que supo sobretodo unir mi familia, Leo. Y al hombre que amé, amo y amaré durante el resto de mi vida, Julián.

Agradecimientos

Este trabajo es el resultado de una amistad forzada, aquella que entre 4 paredes supo superar las diferencias entre cada uno y crear una amistad única. Gracias Meche, Berni, Cami, Joe, Jenny, Juan, Milton, Andrés, Juanjo, a las Estefis, Vero, Majo, a todos los del lab, gracias de verdad.

Gracias Vivi, no hay palabras para agradecerte ni nada que pueda hacer para demostrarte lo inmensamente agradecida que estoy contigo, este trabajo no hubiera sido posible sin ti.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal, gracias y mil veces gracias por ese espacio, ese lugar seguro que me sirvió no solo para aprender los tecnicismos de la carrera, sino a vivir, a disfrutar y a entregar todo sin esperar nada.

Gracias a mis profesores, Lourdes, Venancio, Rodrigo y todos aquellos que en cada clase me sorprendían con sus conocimientos y anécdotas de vida. Gracias por su paciencia. A la Universidad San Francisco de Quito, por darme la oportunidad de seguir mi sueño y alcanzar mis metas, gracias.

Resumen

Las Islas Galápagos representan un ejemplo de un ecosistema frágil donde las plantas introducidas pueden convertirse fácilmente en invasivas. *Psidium guajava* es un ejemplo de ello, debido a su capacidad de propagación rápida y a su fácil dispersión. Estudios anteriores han demostrado que la especie está distribuida a lo largo de todo el Archipiélago y puede representar peligros para la biodiversidad de las islas. Este estudio analizó la diversidad genética de la guayaba en 6 localidades de la isla San Cristóbal y comparó ésta con la diversidad genética encontrada en individuos de guayaba del continente. Se probó un total de 23 pares de primers de los cuales 17 pares amplificaron regiones microsátélites del genoma de la guayaba, en un total de 112 individuos. De éstos, 94 fueron de San Cristóbal y 18 del continente. Se encontró un total de 44 alelos. El fenograma (Neighbor joining) y el análisis de coordenadas principales (PCoA) muestran 3 agrupaciones: continente, sur y norte de la zona de estudio en la isla San Cristóbal. El índice de Nei indica menor diversidad genética en las localidades de la isla (0.010) que en las accesiones del continente (0.171), en tanto que los índices F_{ST} indican una baja diferenciación entre las localidades de la isla y una alta diferenciación de éstas con los individuos del continente. Por otro lado, los resultados de STRUCTURE muestran la estructura poblacional que coincide con los datos de los anteriores análisis mencionados. Estos resultados constituyen información importante que debe completarse analizando un mayor número de individuos de guayaba en otras islas del Archipiélago y en el continente, para poder entender la diversidad genética y estructura poblacional de la guayaba en la isla San Cristóbal. El presente estudio pretende contribuir con la problemática de especies introducidas y aportar a planes de manejo y control sobre estas especies.

Abstract

The Galapagos Islands are an example of a fragile ecosystem, where introduced plants can easily become invasive. *Psidium guajava* is an example of this, due to its fast propagation capacity and ease for dispersion. Previous studies have demonstrated that this species' distribution includes all of the archipelago, and that it may represent a hazard for the islands' biodiversity. This study analyzed the genetic diversity of guava trees from 6 different locations in San Cristobal Island, and a sample from the continental mainland. A total of 23 primer pairs were tested, where 17 pairs amplified microsatellite regions from the guava genome in a total of 112 individuals. From this number, 94 individuals were sampled from San Cristobal and 18 individuals were sampled from the mainland. A total of 44 different alleles were found. The Neighbor Joining phenogram and the Principal Coordinates Analysis (PCoA) show 3 distinct clusters: one of them containing individuals from the continental sample, and the remaining two clusters containing individuals from the northern and southern regions of the San Cristobal area of study, respectively. Nei's genetic distance indicates a lower genetic diversity within the island locations (0.010) compared to the continental sample (0.171), while F_{ST} values show a low genetic differentiation between locations in the island, as opposed to a high level of differentiation from the continental sample. On the other hand, STRUCTURE results show a population structure which coincides with the previously mentioned data. These results provide important information that requires further analyses with a larger sample sizes that includes individuals from other islands in the archipelago and the continent, to further understand the genetic diversity and population structure of guava in the Galapagos Islands. The present study provides new information on the invasive species problematic, and could contribute to management and control plans for this species.

Tabla de contenido

1. Introducción	13
1.1 Especie en estudio, <i>Psidium guajava</i>	13
1.1.1 La guayaba como especie invasiva en las isla San Cristóbal	14
1.2 Diversidad biológica y genética	16
1.2.1 Diversidad genética en ecosistemas insulares	18
1.2.2 Patrones de comportamiento de especies introducidas en ecosistemas insulares...19	
1.3 Marcadores genéticos.....	21
1.3.1 Marcadores microsatélites	23
2. Objetivos	25
2.1 Objetivo general.....	25
2.1 Objetivos específicos	25
3. Área de Estudio	26
4. Justificación	27
5. Materiales.....	29
5.1 Material vegetal	29
5.2 Extracción de ADN	29
5.3 Cuantificación de ADN	30
5.4 Amplificación de regiones microsatélites	30
5.5 Electroforesis en geles de agarosa.....	31
5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	31
5.7 Tinción con nitrato de plata.....	32
6. Métodos.....	33
6.1 Recolección de muestras de hojas de guayaba	33
6.2 Extracción y cuantificación de ADN	34
6.3 Amplificación por PCR	34
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	35
6.5 Toma de datos y análisis de datos	36
7. Resultados	38
7.1 Extracción y cuantificación de ADN	38
7.2 Amplificación de regiones microsatélites con primers homólogos	38
7.3 Análisis de datos	38
8. Discusión.....	43
9. Conclusiones.....	51
10. Recomendaciones	52
11. Bibliografía.....	53
12. Tablas	57
13. Figuras.....	64
14. Anexos.....	73

Contenido de Tablas

Tabla 1. Primers microsatélites utilizados para la amplificación de muestras de guayaba. Kanupriya et al. 2011	57
Tabla 2. Número de muestras de guayaba colectadas por localidad. Concentración máxima obtenida de ADN a partir de la extracción.....	58
Tabla 3. Parámetros de diversidad genética de individuos de guayaba en 6 localidades de la isla San Cristóbal y de individuos del continente.....	61
Tabla 4. Distancias genéticas de Nei (debajo de la diagonal) y distancias geográficas (por encima de la diagonal en km) en las 6 localidades de la isla San Cristóbal y los individuos del continente.....	62
Tabla 5. Valores del Fst de Wright para los 17 loci polimórficos en las 6 localidades de la isla San Cristóbal. Este índice mientras más cercano a 0 indica que existe flujo génico, y mientras más cercano a 1 indica que no existe flujo génico. Los valores para las 6 localidades de San Cristóbal son muy bajo y cercano a 0 lo cual indica que existe flujo génico entre los individuos de las localidades analizadas.	63

Contenido de figuras

- Figura 1. Mapa geo referenciado de las 6 localidades de muestreo y zonificación de las localidades muestreadas en la isla San Cristóbal, Ecuador. Programa utilizado para la creación del mapa ArcMap. Fuente: Richard Resl – USFQ.....64
- Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ADN genómico de 6 muestras de guayaba de 3 localidades de la isla San Cristobal. Se observa de izquierda a derecha el Ladder 100bp (Invitrogen) seguido por 6 muestras de diferentes localidades de la isla (Cerro Verde, El Progreso y El Junco).....65
- Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el Primer 17 en 22 muestras de ADN de guayaba de las localidades El Junco, El Socavón y el continente. Se observa un total de 3 alelos. La temperatura de annealing para este primer es de 55 grados centígrados.....66
- Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el Primer 2 en 20 muestras de ADN de guayaba de las localidades de Cerro Verde, El Progreso, La Soledad y el continente. Se observa un solo alelo, primer monomórfico. La temperatura de annealing para este primer es de 55 grados centígrados.....67
- Figura 5. Fenograma realizado a partir de la matriz de distancia con las 112 muestras de guayaba, usando el programa DARwin 5.0 mediante el método de inferencia Neighbor Joining (unweighed). Se observa la formación de 3 grupos de los cuales 2 (2 y 3) contienen muestras de las 6 localidades de la isla San Cristóbal y un solo grupo (1) muestras del continente.....68
- Figura 6. PCoA obtenido a partir de la matriz de distancia genéticas con datos de las 112 muestras de guayaba de las 6 localidades de la isla San Cristóbal y la muestra del continente utilizando el programa DARwin 5.0. Se observa en los cuadrantes izquierdos muestras del continente con mayor dispersión en color rojo. En los cuadrantes derechos se observan las muestras de la isla. En el cuadrante superior derecho se observan muestras predominantes de color negro correspondientes al norte del área de estudio (Cerro Verde, La Soledad, El Progreso y El Junco). En el cuadrante derecho inferior se observan muestras de color verde que predominan correspondientes el sur del área de estudio (Cerro Gato y El Socavón).....69
- Figura 7. Grafico obtenido a partir del programa STRUCTURE. Se observan dos colores correspondientes al número de grupos ancestrales obtenidos o al valor óptimo de $k = 2$. Para este análisis se incluyo los 112 individuos.70
- Figura 8. Grafico obtenido a partir del programa STRUCTURE. Se observan dos colores correspondientes al número de grupos ancestrales obtenidos o al valor óptimo de $k = 2$. Para este análisis se incluyo únicamente los 94 individuos de las 6 localidades de la isla San Cristóbal.....71
- Figura 9. Zonificación agroecológica en San Cristóbal 2006. Obtenido del Proyecto ECU/00/G31 de zonificación agroecológica de las zonas agropecuarias en relación con las especies invasoras.....72

Contenido de Anexo

Anexo 1. Tabla de las muestras de las 6 localidades de la isla San Cristóbal y sus respectivas posiciones geo referenciadas.	73
---	----

1. Introducción

1.1 Especie en estudio, *Psidium guajava*

La guayaba, *Psidium guajava*, pertenece a la familia de las Myrtaceae. Es nativa de las regiones tropicales donde crece en todo tipo de suelos y climas. Los países que más la comercializan son: México, Brasil, India y Tailandia (Rodríguez, N. et al., 2007). Es considerada como la “fruta del hombre pobre” o “la manzana de los trópicos”. La guayaba es una especie frutal alógama diploide ($2n=22$) (Kanupriya et al., 2011). Existe tanto en forma de cultivo como en forma silvestre (Váldez-Infante et al., 2007).

Es un árbol o arbusto perennifolio que puede llegar a medir desde 3 a 10 metros de altura, con un diámetro del tallo de hasta 60 cm. Sus hojas son simples, con margen entero. El tronco crece generalmente torcido y muy ramificado. Su corteza se caracteriza por escamas lisas y delgadas, de color pardo rojizo y grisáceo. Las flores se encuentran en cimas de hasta 8 cm, son perfumadas, de color verde por el exterior y con pétalos blancos interiormente. Los frutos son bayas que miden hasta 8 cm de diámetro, carnosas de color cremoso amarillento o rosado, muy perfumadas y de sabor agridulce. Cada baya contiene numerosas semillas redondas. Es una especie hermafrodita. Sus semillas se dispersan principalmente por aves o murciélagos frugívoros, germinan en 2 o 3 semanas en promedio. La guayaba se propaga sexual o asexualmente; la propagación por semilla tarda alrededor de 4 años para producir una planta madura con frutos (Bonilla, sf; Caraballo, B.M., 2011).

El cultivo de la guayaba presenta varias ventajas y desventajas. Dentro de las ventajas se encuentra la capacidad de restaurar suelos, fijar dunas, controlar erosión, entre otras. Este cultivo se utiliza en ocasiones para regenerar suelos donde hubo explotación minera. Por otro lado, también se cultiva la guayaba como sombra para ganado, establecer

límites de propiedades o como barreras rompe vientos. La principal desventaja del cultivo es su capacidad o tendencia a propagarse como maleza invasora, característica muy preocupante para agricultores y ganaderos que dependen económicamente de su producción. En potreros se la considera como maleza ya que disminuye la cantidad de pasto para el ganado. Los lugares más afectados por esta característica invasora son sitios aislados como; las Islas Galápagos, Zimbawe, Hawai, Australia y Nueva Zelanda (Bonilla, sf.; Caraballo, B.M., 2001).

Comercialmente, se utiliza tanto la fruta como la madera de la guayaba. El fruto se lo emplea para la fabricación de dulces y mermeladas y también se lo consume fresco. Este fruto posee el doble de vitamina C que la naranja. Por otro lado, su madera es muy cotizada en Malasia para la fabricación de mangos de herramientas e implementos agrícolas. En muchos otros lugares del mundo, también se la utiliza para obtener leña. Finalmente, sus hojas han sido usadas por siglos con fines medicinales, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales (Bonilla, sf.; Caraballo, B.M., 2001).

1.1.1 La guayaba como especie invasiva en la isla San Cristóbal

Las Islas Galápagos, son un grupo de 13 islas principales y varios islotes y rocas que se encuentran justo debajo de la línea ecuatorial a 1.000 km de la costa del Pacífico del Ecuador. En total este Archipiélago consiste en 7.880 km² situado sobre la placa de Nazca, la cual se mueve en dirección Sur-Este hacia al Ecuador continental aproximadamente entre 3 y 4 cm por año (Brewington, L., 2011).

El movimiento de las corrientes de Humbolt y Panamá, fría y caliente respectivamente, chocan en la línea ecuatorial, creando una época caliente y lluviosa de enero a junio, seguida por una época fría de julio hasta diciembre. Este movimiento de corrientes tiene una influencia enorme en las islas más grandes del Archipiélago; crea ecosistemas únicos y diferentes en cada una ellas. La inusual flora y fauna de Galápagos

emerge de estas características únicas y generan un inmenso interés en áreas de las ciencias biológica y evolutivas (Brewington, L. 2011).

Las Islas Galápagos se descubrieron en 1535 por Fray Tomás de Berlanga. Se considera que todo organismo vivo que llegó después de esta época es introducido. Cuando Charles Darwin visitó las Islas Galápagos en 1835, en éstas habitaban muchas especies, algunas endémicas y otras que desde hace siglos habían llegado por corrientes marinas, aire o por naufragios de barcos piratas que naufragaban en este lugar (Brewington, L., 2011).

A partir de 1800, la presencia de poblaciones humanas y especies foráneas empezó a incrementar cada vez más en las Islas Galápagos. Hasta 2010 se ha reportado la presencia de más de 879 especies introducidas de plantas, 11 de pájaros, 8 de reptiles, 15 de mamíferos y 543 de insectos. La agricultura es la responsable de la introducción de varias especies de plantas, muchas de las cuales se han convertido en invasivas. Se conoce que la guayaba fue introducida a finales de 1800 con fines agrícolas, pero su rápida dispersión entre localidades agrícolas y dentro del Parque Nacional Galápagos, facilitada por pájaros, burros, ganado y chanchos, la convirtió en poco tiempo en una especie invasiva (Velasco, M., 2002). Esta especie transforma el paisaje de las Islas Galápagos y altera la vegetación, el suelo y su composición, haciendo de esta especie una amenaza para especies nativas y cultivos agrícolas presentes (Brewington, L., 2011).

En 1970, Itow encontró guayaba en isla Isabela, tanto en zonas agrícolas como en tierras que lindan el Parque Nacional Galápagos. La llamo el “intruso más disperso” en la isla Isabela. En el estudio de Walsh et al.(2007) se estima que la guayaba cubre más de 40.000 hectáreas al sur de la isla Isabela. Se conoce que para el año 1960, en esta isla existían más de 190 fincas, en el 2006 se reportan solamente 97. Las 93 fincas ahora abandonadas y convertidas en potreros son actualmente las zonas con más alta densidad de

guayaba. Otras islas como Santa Cruz tienen escenarios parecidos. Humberto Ochoa, ex director del área agropecuaria del Parque Nacional Galápagos durante 1986-1988, describe que en menos de 10 años los potreros de haciendas enteras en Santa Cruz se han convertido en guayabales (Chiriboga et al., 2006).

La isla San Cristóbal se ha caracterizado por una elevada presencia de especies botánicas invasoras en la zona agropecuaria. En 1996 Carpio diagnosticó que más del 21% de la superficie rural estaba ocupada por plantas invasoras. Las especies invasoras más dispersas en San Cristóbal son: la guayaba, la mora, la pomarrosa y la supirrosa. La guayaba se ha propagado dentro de San Cristóbal por más de 150 años. Se cree que fue introducida por primera vez por habitantes de la costa ecuatoriana que poblaban la hacienda de Manuel. J. Cobos en el año 1879. Se cree que esta especie se dispersó durante épocas de sequías en la isla debidas al sobrepastoreo (Chiriboga et al., 2006).

En las últimas décadas se han hecho algunos esfuerzos para controlar las poblaciones de guayaba en Islas Galápagos. Una de las últimas iniciativas del Parque Nacional Galápagos en San Cristóbal es la siembra de especies endémicas y la entrega de incentivos a los agricultores para que eliminen la guayaba de sus tierras. Esta iniciativa inició en el 2012 y para finales del 2013 se esperaba extenderla a otras islas, principalmente Santa Cruz e Isabela (El Universo, 2013).

1.2 Diversidad biológica y genética

La diversidad biológica puede ser definida como la variación presente entre especies de plantas, animales, bacterias y otros seres vivos, su material genético y el ecosistema en donde estas variaciones ocurren. Esta diversidad ocurre en tres niveles: la diversidad genética, la diversidad de especies y la diversidad de ecosistemas (Ramanatha, V., Hodgkin, T., 2002). La diversidad biológica ha sido reconocida como un elemento

esencial para que actividades humanas, tales como la agricultura, se desarrollen de manera sostenible a través del tiempo.

El mecanismo utilizado por agricultores desde hace mucho tiempo ha sido el mejoramiento de cultivares por medio de selección de los mejores individuos y esto ha reducido la base genética dentro de los cultivares. Esta actividad refleja la importancia de la diversidad genética en la agricultura ya que es un elemento esencial para la supervivencia del cultivo y la obtención de mejores productos. La reducción de la diversidad genética en cultivos vegetales implica una gran vulnerabilidad para el sistema agrícola, ya que la diversidad constituye una fuente de mecanismos de defensa contra plagas, enfermedades, cambios climáticos, entre otros factores que puedan afectar la productividad y sobrevivencia del cultivo. Para evitar esto, hoy en día se llevan a cabo programas de conservación tanto *in situ* como *ex situ* de cultivos agrícolas tanto como de sus antepasados silvestres. Se reconoce que los recursos genéticos vegetales son los de mayor importancia, por lo cual merecen mayor atención (Ramanatha, V., Hodgkin, T., 2002).

La diversidad genética es la cantidad de variabilidad genética en los individuos dentro de una población o una variedad. Esta diversidad se manifiesta en diferencias de la secuencia de ADN, en características bioquímicas, en propiedades fisiológicas o en morfología. Existen componentes de la diversidad genética que son útilmente distinguibles: el número de alelos encontrados en diferentes individuos o poblaciones, la distribución de los mismos, el efecto sobre el rendimiento y las diferencias generales entre poblaciones. La variación que se visualiza entre individuos proviene de mutaciones y recombinaciones. La selección, la deriva génica y el flujo de genes son causantes de las variaciones y la diversidad entre especies (Ramanatha, V., Hodgkin, T., 2002).

1.2.1 Diversidad genética en ecosistemas insulares

Las poblaciones de especies en islas son mucho más propensas a la extinción que las poblaciones en el continente. Las razones por las cuales la tasa de extinción se ve aumentada son controversiales y desconocidas. En términos generales las poblaciones insulares pueden ser más pequeñas o incluso submuestras de las poblaciones continentales. Esto puede promover procesos de endogamia y pérdida de variación genética, lo cual explicaría la vulnerabilidad de estas poblaciones y su mayor tasa de extinción (Frankham, R., 1997; Golstman et al. 2005).

Las actividades humanas han sido responsables de la extinción de cientos de especies durante más de 50 000 años. El World Conservation Monitoring Centre reporta que la introducción de especies exóticas y la destrucción de hábitats son las causas más importantes para la extinción de especies, seguidas por la sobre explotación. Otro dato de gran interés es que se ha reportado que desde 1600 una gran parte de las extinciones documentadas de mamíferos, reptiles y aves ha ocurrido en ecosistemas insulares. Esto debido a la gran vulnerabilidad que representan estos ecosistemas (Frankham, R., 1997).

La susceptibilidad de las poblaciones insulares se puede predecir en términos genéticos. En islas oceánicas se espera una pérdida de variación genética al momento de la llegada de las especies a estos ecosistemas. Debido a que pocos individuos llegan a una isla y tienen éxito, ocurre lo que se conoce como un cuello de botella. Este número reducido de individuos posee una limitada variación genética como materia prima para cambios evolutivos que se requiere para colonizar nuevos hábitats. Esta pérdida de variación genética no permite que las poblaciones evolucionen en respuesta a cambios ambientales, climáticos, nuevas enfermedades, parásitos, predadores y competidores y otros cambios (Frankham, R., 1997; Glover y Barret, 1968).

En una población que ha pasado por un proceso de cuello de botella, la predicción de heterocigocidad y potencial evolutivo se reduce considerablemente. Se puede predecir la pérdida de heterocigocidad inmediata siguiendo la ecuación:

$$(1/2Ne) \times 100 = \% \text{ de pérdida de heterocigocidad}$$

Donde Ne es el número de individuos que llegan a la isla y logran reproducirse.

Por ejemplo, si solamente 4 individuos que llegan a un ecosistema insular logran reproducirse se tiene:

$$(1/2(4)) \times 100 = 12.5\% \text{ de pérdida de heterocigocidad}$$

Se espera que la pérdida de heterocigocidad sea mayor en ecosistemas insulares debido a que el número de individuos fundadores es menor y las tasas de inmigración son bajas. Estas características deben ser consideradas caso por caso, se debe tomar en cuenta el tamaño de la población en la isla y en el continente, el tamaño de la isla, la cercanía entre islas y el continente, las especies endémicas; entre otros factores que puedan afectar esta ecuación (Frankham, R., 1997; Glover y Barret, 1986).

1.2.2 Patrones de comportamiento de especies introducidas en ecosistemas insulares.

Las cadenas de islas se han considerado laboratorios naturales para el estudio de procesos evolutivos. Sin embargo, esta característica de aislamiento y diversidad conlleva a las especies insulares a ser muy susceptibles para la extinción (Randell et al., 2004). Estos frágiles ecosistemas son perfectos escenarios para que plantas sean introducidas accidental o voluntariamente para diferentes usos. Dentro de este nuevo escenario para nuevas especies, algunas de éstas se establecen, dispersan y se convierten en invasivas. Estas especies introducidas invasivas se han convertido en un foco de estudio para la conservación ya que estos invasores compiten con especies locales por limitados recursos y alteran el ecosistema. Los eventos de introducción de especies a ecosistemas insulares han

aumentado rápidamente con la globalización y el transporte hacia y desde estos ecosistemas (Besnard et al., 2007).

Las especies introducidas que se vuelven invasivas representan una amenaza para la biodiversidad, la integridad de los ecosistemas, la agricultura, entre otras actividades como la ganadería e inclusive el turismo. Las características genéticas de las poblaciones invasivas son un tema de interés ya que determinan la capacidad de las mismas para su expansión. Tanto la selección natural como la deriva génica influyen en las poblaciones invasivas para que éstas modifiquen su tolerancia a climas nuevos, nuevos depredadores o comportamiento. También es importante mencionar que las especies invasivas son capaces de inducir cambios evolutivos en especies nativas alterando su estructura genética, esto ocurre mediante hibridación, reduciendo las poblaciones de especies nativas e incluso alterando la disponibilidad de nutrientes presentes en el suelo (Glover y Barret, 1968). Como consecuencia de estos eventos es importante incorporar la genética evolutiva para revelar las características que determinan una invasión exitosa por parte de una especie introducida (Lee, C., 2002).

Existen estudios donde se trata de mostrar la reducción de variabilidad genética en especies insulares versus esas mismas especies en el continente. Estos estudios muestran como en especies no endémicas, las poblaciones del continente muestran una mayor heterocigocidad que en las poblaciones de las islas. En poblaciones continentales también se ha observado una diversidad alélica y un porcentaje de polimorfismo más elevado en comparación con poblaciones insulares. Estos datos han sido reportados tanto para plantas, como para animales, especialmente mamíferos y reptiles. Sin embargo, en especies como insectos, aves y murciélagos que pueden volar, la diferencia entre poblaciones continentales e insulares es menor (Frankham, R., 1997).

En cuanto a especies introducidas, se observan los mismos patrones de reducción de diversidad. Las poblaciones introducidas muestran niveles inferiores de heterocigocidad en comparación con la población “original”. Este fenómeno puede deberse, entre otros factores, al limitado pool genético que tendrá la población introducida en el nuevo ecosistema (Frankham, R., 1997). Si bien existen estudios acerca de la diversidad genética de especies introducidas en islas, aún queda mucho por estudiar.

1.3 Marcadores genéticos

Un marcador genético es todo loci, es decir cualquier fragmento de ADN que indique una posición o una presencia cercana de un gen de interés que se desea utilizar. Para que este marcador sea utilizado debe tener varias características: debe ser de detección fácil y rápida, expresión temprana, ausencia de interacciones con otros marcadores, utilización de cantidad mínima de muestra o de ADN, distribución homogénea a lo largo del genoma y un elevado polimorfismo. La utilización de estos marcadores es la clave para el mejoramiento e identificación de plantas (Cubero, 2002).

Existen varios tipos de marcadores que se utilizan hoy en día. Inicialmente los marcadores morfológicos eran los más utilizados. Sin embargo, aunque son marcadores considerados inmediatos por ser visibles, una de las principales desventajas es que se debe esperar el desarrollo completo de los individuos para poder identificar el fenotipo que se busca caracterizar. Adicionalmente, estos marcadores están limitados por el número de características morfológicas que se puede estudiar, porque no permiten estudiar codominancia y en muchos casos son pleiotrópicos (afectación de varias funciones por acción de un solo gen) (Cubero, 2002). Por estas razones, este tipo de marcadores no cumple con todas las características mencionadas anteriormente para ser calificados como un buen marcador.

Otro tipo de marcadores, son los marcadores moleculares. Estos son fragmentos de ADN y pueden ser de tamaños muy diferentes. Este tipo de marcador tiene varias ventajas sobre otros debido a que: se pueden detectar variaciones con mínimas cantidades de material biológico de partida, su detección no afecta al fenotipo, pueden detectarse en cualquier estado del desarrollo del individuo, se distribuyen a lo largo del genoma, algunos de éstos son codominantes, poseen alto grado de polimorfismo, entre otras características deseadas (Cubero, 2002).

Existen muchos marcadores moleculares que se basan en la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Mediante esta técnica es posible sintetizar millones de copias de un fragmento de ADN de interés en pocas horas. Se la utiliza para replicar una región específica de ADN en millones de copias utilizando oligonucleótidos o primers diseñados previamente como secuencias complementarias que se hibridan en los extremos de la región que se desea amplificar. Esta técnica consiste en la unión de estos primers al fragmento de interés y por medio de la polimerasa y los nucleótidos agregados, replicar el fragmento que sirve como plantilla en cada ciclo de amplificación. Cada ciclo para esta reacción consiste en varios pasos: denaturación de las hebras de ADN a temperatura alta, anidación de los primers con las regiones a amplificar a una temperatura específica, y extensión de la cadena copiada mediante la ADN polimerasa para incorporar los nucleótidos. El ciclo debe repetirse varias veces para obtener un número de copias que pueda ser visualizado utilizando otras técnicas moleculares (Erlich, H., 1989).

Existen varios tipos de marcadores moleculares, entre ellos se encuentran los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), los cuales fueron los primeros en aparecer y fueron utilizados por varios años para la construcción de mapas genéticos. Otros marcadores son los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), que superan a los anteriores en rapidez y menores costos. Éstos tienden a ser difíciles de replicar. Sin

embargo, al no ser costosos y rápidos se los utiliza para la creación de mapas preliminares (Cubero, 2002). Los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los SCAR (Sequenced Characterized Amplified Region) son otros tipo de marcadores muy utilizados. Sin embargo los marcadores microsatélites (SSR; Simple Sequence Repeats) tienen varias ventajas frente a los antes mencionados. Estos poseen un nivel elevado de polimorfismo, son codominantes, son fácilmente replicables y si ya están diseñados para la especie a estudiar, el costo no es muy elevado.

1.3.1 Marcadores microsatélites

Los marcadores microsatélites, SSR, son secuencias de ADN que consisten en repeticiones tándem mono, di-, tri-, tetra- o penta- nucleótidos repartidos a lo largo del genoma (Powel et al., 1996). Fueron descubiertos por primera vez por Hamada et al. 1982. Las repeticiones de dinucleótidos (GT, AT, GA, etc.) son más comunes que otras repeticiones de tri- o tetra- nucleótidos. Estas secuencias repetidas en el ADN se las denomina motivos y estos motivos varían en abundancia entre diferentes organismos. Motivos como (CA)_n son más comunes en mamíferos y motivos como (AT)_n son los más comunes en plantas. Se sabe que en plantas estos motivos repetidos ocurren cada 30 a 100 kb (Powel et al., 1996).

La presencia de estas secuencias en tándem en el genoma de una especie se debe a varias razones, como inserciones, sustituciones, deslizamiento de la polimerasa, etc., que dan como resultado secuencias que se expanden o reducen creando variaciones (polimorfismos) entre individuos. Los marcadores microsatélites son buenos marcadores genéticos ya que cumplen con las características antes mencionadas: distribución a lo largo de todo el genoma, polimorfismo, detección en cualquier estado de desarrollo, poco material genético inicial, etc. (Powel et al., 1996).

El uso de éstos marcadores puede estar restringido por el elevado costo que implica su identificación y secuenciación. Sin embargo, cuando éstos están ya diseñados para la especie en estudio son la primera opción. En caso de la especie en esta investigación, *Psidium guajava*, se conocen más de 50 pares de primers homólogos, de los cuales 23 son los más utilizados para estudios de diversidad genética de esta especie; 17 de los 23 mencionados fueron exitosos para el presente estudio (Risterucci et al., 2005).

El presente estudio utilizó 23 combinaciones de primers para determinar la diversidad genética de 94 individuos de guayaba en la isla San Cristóbal y 18 del Ecuador continental. Este estudio constituye un acercamiento inicial para conocer la diversidad genética de esta importante especie invasiva en las Islas Galápagos. Conocer su distribución y diversidad constituye un primer paso para, junto con estudios botánicos y ecológicos, servir como sustento y apoyo para la ejecución de planes de manejo y control de la guayaba en San Cristóbal.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Determinar la diversidad genética de la guayaba, *Psidium guajava*, en 6 localidades de la isla San Cristóbal mediante el uso de marcadores microsatélites.

2.1 Objetivos específicos

- Estandarizar un protocolo de extracción de ADN para la guayaba.
- Determinar la diversidad de la guayaba en 6 localidades de la isla San Cristóbal con el uso de 17 marcadores SSR homólogos.
- Comparar la diversidad genética de la guayaba de 6 localidades de la isla San Cristóbal con una muestra de individuos de guayaba del continente.

3. Área de Estudio

La recolección del material vegetal se realizó en 6 localidades agrícolas de la isla San Cristóbal, Ecuador (El Progreso, La Soledad, Cerro Verde, Cerro Gato, El Socavón y El Junco). En cada localidad se recolectó muestras de 3 haciendas, las cuales fueron nombradas de acuerdo a su dueño o persona encargada. En cada localidad se colectó un total de 15 individuos mínimo, 5 individuos por hacienda (Anexo 1, Tabla 1). Adicionalmente, se recolectó 18 individuos de diferentes localidades de Ecuador continental, 15 individuos de Pedernales, provincia de Manabí y 3 individuos de Cumbayá, provincia de Pichincha. La extracción, cuantificación y dilución del ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Galápagos Science Center (GSC) en San Cristóbal. La amplificación del ADN, la electroforesis en geles de poliacrilamida y el análisis estadístico de las muestras de guayaba se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

4. Justificación

Se conoce que una de las mayores amenazas para la biodiversidad, son las especies invasivas, especialmente en islas. Aunque hoy en día se conoce mejor los mecanismos que facilitan que una especie se vuelva invasiva, este conocimiento se basa principalmente en especulaciones y observaciones limitadas (Jager et al., 2007). Los hábitats terrestres de las Islas Galápagos están siendo amenazados seriamente por especies introducidas invasivas. Estas especies se encuentran principalmente en localidades agrícolas y urbanas, pero tienen la habilidad de traspasar estas fronteras e invadir terrenos en áreas protegidas (Itow, S., 2003). Existen alrededor de 900 especies de plantas introducidas en las Islas Galápagos, sobrepasando el número de especies nativas y endémicas (552) (Tye, A., 2002). Del número total de especies introducidas, aproximadamente 30 son consideradas como agresivas o invasivas (Hamann, O., 1991; Itow, S., 2003), lo que quiere decir que son especies de fácil dispersión y que ocupan extensas superficies, alterando drásticamente la estructura de las comunidades de las islas (Bensted-Smith, R., 2002).

Los patrones de dispersión de especies invasoras son el resultado de procesos naturales en conjunto con las diferentes formas en las cuales los seres humanos manejan su ambiente (Iovanna, R., Vance, C., 2007). Por lo tanto, un sistema efectivo para el control y manejo de especies invasoras debería basarse en el entendimiento de las interacciones entre seres humanos y factores ambientales que influyen en la dispersión de estas especies.

Entre las especies de plantas introducidas en las Islas Galápagos, la guayaba, *Psidium guajava*, que fue introducida desde el Ecuador continental aproximadamente en 1850, y es ahora una especie invasora (Bensted-Smith, R.; Walsh, S.J, et al. 2007). La dispersión exitosa y la distribución extensiva de la guayaba en Galápagos sugieren la existencia de diversas y efectivas estrategias de adaptación y sobrevivencia.

Muy poco se conoce sobre los factores sociales y ambientales que afectan la dispersión de guayaba en la isla San Cristóbal o en cualquier otra isla del Archipiélago y el verdadero impacto que este hecho está ocasionando en los ecosistemas nativos (Bensted-Smith, R. 2002; Walsh, S.J, et al. 2007). En un estudio piloto en la isla San Cristóbal se ha encontrado que en áreas donde existe guayaba, los tejidos vegetales tienen una cantidad significativamente menor de nitrógeno orgánico que en áreas con especies nativas u otras especies introducidas de plantas (ejemplo: café), lo que sugeriría que la guayaba podría estar afectando el ciclo del nitrógeno en las Islas Galápagos (de la Torre, en prep).

La información acerca de la diversidad genética de las distintas poblaciones de una especie en un área geográfica determinada contribuye a entender la dinámica ecológica de la especie y ayuda a establecer programas de manejo adecuados. Por lo tanto, el proyecto que se propone es la fase inicial de una investigación cuyos resultados pretenden contribuir a comprender mejor la problemática de las especies invasoras en ecosistemas insulares y de esta manera poder desarrollar a mediano plazo mecanismos apropiados de control y manejo.

5. Materiales

5.1 Material vegetal

- Hojas de 94 individuos de guayaba recolectadas provenientes de 6 localidades agrícolas de la isla San Cristóbal (Anexo 1)
 - El Junco: Hacienda Guido Rocillo (5 muestras), Hacienda Juan Matapunelio (6 muestras), Hacienda Tito C. (7 muestras)
 - Cerro Gato: Hacienda Jorge Chuquimarca (5 muestras), Hacienda Jaime Ricaurte (5 muestras), Hacienda Milton Aguas (5 muestras)
 - El Socavón: Hacienda Centro Agrícola (5 muestras), Hacienda Esperanza Criollo (5 muestras), Hacienda Gonzáles (5 muestras)
 - La Soledad: Hacienda Cristóbal Pallo (5 muestras), Hacienda Fernando Criollo (5 muestras), Hacienda La Tranquila (5 muestras)
 - El Progreso: Hacienda Braulio Pallo (5 muestras), Hacienda Gato Ortiz (5 muestras), Hacienda Miguel Guerrero (5 muestras)
 - Cerro Verde: Hacienda Ángel Alvarado (5 muestras), Hacienda Buena Esperanza (5 muestras), Hacienda Máximo Becerra (6 muestras)
- Hojas de 18 individuos de guayaba recolectadas en 2 localidades de Ecuador continental.
 - Pedernales, provincia de Manabí (15 muestras)
 - Cumbayá, provincia de Pichincha (3 muestras)

5.2 Extracción de ADN

- Muestras de hojas de guayaba
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol
- Nitrógeno líquido
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- 2, B-mercaptoetanol

5.3 Cuantificación de ADN

- ADN de guayaba extraído
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- NANODROP 1000 (Thermo Scientific)

5.4 Amplificación de regiones microsatélites

- ADN de guayaba
- 23 pares de primers homólogos (Kanupriya et al., 2011)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- Tubos Eppendorf 0.2mL
- Taq ADN polimerasa 5U/μL (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTPs 10 mM (Invitrogen)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

5.5 Electroforesis en geles de agarosa

- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR
- SeaKem® LE Agarose
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- TBE 1X (Tris – Acido Bórico – EDTA)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)

5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- UltraPure™ N,N' - Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (Tris – Ácido Bórico – EDTA)
- Ultra Pure™ UREA (Invitrogen)
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine)
- Sigmacote® (SIGMA)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)
- Bind-Silane (3-Methacryloxypropyltrimethoxysilane)
- Solución de tratamiento de vidrios (etanol 96 %, ácido acético 0.5%)
- Rain.X™ Ladder 10bp (Invitrogen)

- Buffer de carga (Glicero , Azul de Bromofenol)
- Etanol 70%

5.7 Tinción con nitrato de plata

- Cámara de fotos Canon XPOSZ
- Transiluminador de luz blanca
- Agua destilada
- Ethyl Alcohol Denatured (J.T. Baker)
- Solución Fijación/ Parada (Alcohol Absoluto J.T. Baker^R 10% v-v, Ácido Acético Glacial Merck^R 0.5% v-v)
- Solución Tinción (Nitrato de Plata Fisher Scientific^R 2g/L, Formaldehído J.T. Baker^R 37% 0.00015% v-v)
- Solución Revelado (Hidróxido de Sodio Merck^R 15g/L, Formaldehído J.T. Baker^R 37% 0.0002% v-v)

6. Métodos

6.1 Recolección de muestras de hojas de guayaba

El material vegetal se recolectó en zonas agrícolas de San Cristóbal. Se recolectaron 94 muestras de hojas de guayaba distribuidas en 6 localidades: El Junco, El Socavón, El Progreso, La Soledad, Cerro Verde y Cerro Gato (Figura 1). De cada localidad se escogieron tres haciendas y se recolectaron de tres a cinco individuos por hacienda hasta coleccionar un total de muestras de 15 individuos por localidad. En términos generales, en cada una de estas haciendas existía un alto número de árboles de guayaba que, sin embargo, no constituían un cultivo sino que más bien estaban distribuidos al azar en el terreno. Los árboles de guayaba muestreados estaban distanciados aproximadamente 300m uno de otro y se tomó de 4 a 5 hojas jóvenes de cada uno. Las muestras fueron colocadas en fundas Ziploc^R dentro de hieleras a 4°C, para mantener la cadena de frío hasta el Laboratorio de Biología Molecular del Galápagos Science Center (GSC) en la isla San Cristóbal donde se colocaron en un congelador a -20°C hasta la extracción del ADN. Para cada muestra se tomó las coordenadas satelitales del sitio de recolección con la ayuda de un GPS.

Las muestras de guayaba del continente se recolectaron de dos provincias, Pichincha y Manabí. Las muestras de Pichincha se las obtuvo de 3 árboles localizados dentro del campus Cumbayá de la Universidad San Francisco de Quito. Las muestras de Manabí fueron recolectadas a lo largo de la carretera Pedernales-Cojimíes con un distancia promedio de 500 metros entre árbol. El protocolo de muestreo utilizado fue igual al utilizado para las muestras insulares.

Con estas muestras la colección para el estudio estuvo finalmente constituida por 112 individuos de *Psidium guajava*.

6.2 Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN a partir de hojas de guayaba se realizó utilizando el protocolo con buffer CTAB de Shagai-Marroof, et al. 1984 pre-estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito con algunas modificaciones. Se colocó aproximadamente 100 mg de tejido vegetal en un mortero y se lo molió con nitrógeno líquido. El polvo resultante se lo recogió en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó buffer CTAB y B-mercaptoetanol y se incubó las muestras a 62°C durante una hora. Se agregó una mezcla de cloroformo-álcool isoamílico (24:1) y se centrifugó por 20 minutos a 13200 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó isopropanol frío. A continuación se sometió los tubos a una nueva centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%. Finalmente se dejó secar el pellet y se lo resuspendió en 50 uL de buffer tris-EDTA (TE). La calidad de ADN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Figura 2). Las muestras de ADN fueron conservadas a -20°C.

La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría con el uso de un Nanodrop 2000 ThermoScientific™. Se diluyó el ADN a una concentración de 20 ng/ul para su posterior uso en las reacciones de amplificación por PCR.

6.3 Amplificación por PCR

La selección de primers se la realizó de acuerdo a publicaciones relacionadas del género *Psidium*. Para la presente investigación se escogieron las 23 combinaciones de primers ensayadas en el estudio de Kanupriya y colaboradores (2011) (Tabla 1).

Las reacciones de PCR y condiciones de ciclado utilizadas fueron las descritas en el estudio de Kanupriya et al. (2011). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 ul y contenían 20 ng de ADN, Buffer de PCR 1 X, MgCl₂ 1.5 mM, 0.2 mM de cada primer, 200 μM de dNTPs, y 0.5 U de Taq Polimerasa. El programa de ciclado

consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 45 segundos, annealing de 52°C o 55°C dependiendo del primer (Tabla 1) por 1 minuto, y finalmente un período de extensión a 72°C por 1 minuto. Para completar el ciclado se terminó con una temperatura de extensión de 72°C por 8 minutos.

Se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5% para comprobar la amplificación exitosa con los primers utilizados. Cuando el resultado fue positivo se pasó a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La electroforesis en geles de poliacrilamida se realizó utilizando el sistema SequiGen GT de Biorad^R. El primer paso fue el lavado y tratamiento del vidrio y la cámara. El vidrio se lavó con Alconox y se lo limpió con alcohol al 70%, a continuación se lo trató con Bind-Silane. Para la cámara se realizó un lavado con Alconox, con alcohol al 70% y se la trató con RainX y Sigmacote.

El armado de la cámara de electroforesis se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante, limpiando previamente todos sus componentes con alcohol al 70%. Una vez armada la cámara se añadió 100mL de una solución de poliacrilamida (urea 5M, acrilamida: bisacrilamida 19:1, Temed y persulfato de amonio 0.1%) y se colocó el peine para formar el frente de corrida. Una vez polimerizada la poliacrilamida, se añadió 400mL de TBE 1X en la base de la cámara y 1100 ml dentro de la cámara. Se sacó el peine y con la ayuda de una pipeta Pasteur se retiró la urea sobrante, se insertó el peine con los dientes hacia adentro para formar los pocillos y nuevamente con la pipeta Pasteur se retiró la urea. Se cargó 3 μ L de buffer de carga saltando un pocillo y se realizó una precorrida por 45 minutos a 80 watts con el fin de comprobar la calidad de los pocillos. Una vez transcurrida

la precorrida, se cargó $5\mu L$ del producto del PCR de cada una de las muestras de guayaba después de haber sido denaturadas a 90 grados centígrados por 6 minutos. Las condiciones de corrida consistieron en 2 horas y media a 80 watts a una temperatura máxima de 50 grados centígrados.

El revelado de los geles de poliacrilamida se realizó por medio de una tinción con nitrato de plata de acuerdo al protocolo de Benbouza et al.(2006) con algunas modificaciones. Esta consistió en un paso inicial de 5 minutos en una solución fijadora (200 ml de alcohol absoluto, 10 ml de ácido acético glacial y 1790 ml de agua destilada) que previamente debía estar refrigerada. Posteriormente se colocó el vidrio con el gel cara arriba en una solución de tinción (4 gramos de nitrato de plata, 3 ml de formaldehido al 37% y 2 litros de agua destilada) por 7 minutos en agitación constante. Luego se realizó un lavado con agua destilada por 8 segundos y se pasó el vidrio con el gel a una tercera solución, la solución de revelado (30 gramos de hidróxido de sodio, 4 ml de formaldehido al 37%, y 2 litros de agua destilada) por 7 minutos con agitación constante. Seguido se colocó el vidrio nuevamente en la solución fijadora por 3 minutos, transcurrido el tiempo se realizó un segundo lavado con agua destilada. Para el análisis de datos se dejó secar el vidrio en posición vertical durante toda una noche.

6.5 Toma de datos y análisis de datos

La toma de datos se realizó colocando el vidrio con el gel en el transiluminador de luz blanca. El primer paso fue la construcción de una matriz de ausencia y presencia de bandas. El tamaño de las bandas o alelos se obtuvo por regresión lineal. También se construyó una matriz codominante, en la cual cada alelo está representado por un número que corresponde a su tamaño en pares de bases.

La matriz codominante fue utilizada para generar una matriz de distancia mediante el software DARwin 5.0 (Perrier, X., Jacquemoud-Collet, J.P., 2006), y usando el método Simple Matching con un total de 500 bootstraps. El mismo programa fue utilizado para construir un fenograma por el método de inferencia Neighbor Joining (unwieghed), y un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), mediante un análisis factorial.

Algunos índices de diversidad genética (diversidades alélicas, índices de Shannon para diversidades genotípicas, heterocigosidades observadas y esperadas e índices de fijación) y distancias genéticas (distancias de Wright *Fst* y distancias de Nei) fueron obtenidas mediante el software GenAlEx 6.5 (Peakall, R. y Smouse P.E., 2006). Este mismo programa fue utilizado para investigar la correlación entre distancias genéticas y geográficas para muestras insulares mediante una prueba pareada de Mantel con 999 permutaciones.

La inferencia de la estructura poblacional de las muestras recolectadas se estableció mediante estadística Bayesiana utilizando el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2004). Se realizaron 15 corridas independientes, probando valores de *k*, entre 2 y 6, con un máximo de 100000 pasos de burning y 100000 pasos de cálculos Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Este análisis se realizó en dos etapas, la primera analizando las muestras de las 6 localidades de la isla San Cristóbal más las muestras del continente y la segunda excluyendo las muestras continentales. Los valores óptimos de *K*, fueron determinados utilizando el método de Evanno et al. (2005). Los alineamientos de las corridas múltiples fueron generados utilizando un algoritmo *greedy*, en el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg, 2007).

7. Resultados

7.1 Extracción y cuantificación de ADN

Se logró la estandarización para la extracción de ADN de guayaba. Se extrajo ADN de las 112 muestras colectadas (94 en San Cristóbal y 18 en Ecuador continental) (Tabla 2). El ADN obtenido fue de buena calidad y varió entre 75ng/ μ L y 3888ng/ μ L.

7.2 Amplificación de regiones microsátélites con primers homólogos

Se probó los 23 pares de primers homólogos para guayaba, reportados en el estudio de Kanupriya et al. (2011) que fueron evaluados en ese estudio, para 9 cultivares de guayaba. En la presente investigación de los 23 pares de primers probados, se obtuvo amplificación únicamente con 17 combinaciones de ellos. Con los 6 pares de primers restantes no se logró amplificación de ADN de las muestras de guayaba pese a distintas variaciones realizadas en la reacción de PCR y condiciones de ciclado. En el estudio de Kanupriya et al. (2011) se encontró un total de 147 alelos para los 23 loci, con un promedio de 6.39 alelos por locus. En el presente estudio se encontró un total de 43 alelos, de 1 a 4 por locus (en promedio, 2.53 alelos por locus) (Tabla 3). Los loci de los individuos de guayaba analizados mostraron ser poco polimórficos en la mayoría de los casos. Los loci más polimórficos fueron los analizados con los primers mPgCIR05, mPgCIR10 y mPgCIR17, en cada uno se identificó 4 alelos (Figura 3). Por otro lado, los loci analizados con los primers mPgCIR01, mPgCIR02, mPgCIR14 y mPgCIR19 fueron monomórficos (Figura 4).

7.3 Análisis de datos

En el fenograma realizado por medio del programa DARwin 5.0, para las 112 muestras (94 de la isla San Cristóbal y 18 del continente), se puede observar la formación

de 3 grupos principales (Figura 5). El grupo marcado con el número 1, de color rojo, representa las 18 individuos muestreados en el continente; está separado de los grupos 2 y 3 que representan a las muestras de guayaba de la isla San Cristóbal. En el grupo 2 (color verde) se ubican mayoritariamente muestras de Cerro Gato y Socavón, las dos localidades localizadas en la zona sur del área de estudio de la isla San Cristóbal. En el grupo 3 (color negro) se localizan la mayor parte de muestras de las localidades El Progreso, La Soledad, Cerro Verde y El Junco, localizadas de la parte norte en el área de estudio de la isla San Cristóbal. La separación del grupo 1 con los grupos 2 y 3 está claramente definida. Sin embargo entre los grupos 2 y 3 la separación no es tan marcada entre localidades, es decir, algunas muestras de Cerro Gato y Socavón se agrupan en el grupo 3, y algunas muestras de las localidades agrupadas en el grupo 3 también aparecen en el grupo 2. Adicionalmente, en la Figura 5 también se puede observar los valores de bootstrap para cada una de las agrupaciones que aparecen en el fenograma. Como resultado de este análisis, los valores de bootstrap son más altos para agrupaciones entre muestras de continente en comparación de las agrupaciones para muestras de la isla San Cristóbal. Los valores de bootstrap indican fiabilidad de los agrupamientos de acuerdo a su probabilidad de ocurrencia en las diferentes permutaciones realizadas. Se considera que un valor de bootstrap superior a 50 indica fiabilidad de un agrupamiento. Como se puede observar, la mayor parte de agrupamientos entre muestras del continente son mayores a 50, mientras que en la isla la mayor parte de agrupamientos tienen bootstraps menores a 50.

El Análisis de Coordenadas Principales (Figura 6), respalda la información obtenida en el fenograma. Se puede distinguir también la formación de tres grupos. El grupo que aparece en color rojo corresponde únicamente a individuos de guayaba del continente, que se localizan en los cuadrantes superior e inferior izquierda, se observan que los individuos están más distanciados en la figura (pese al bajo número de individuos muestreados). En

los cuadrantes derechos se observa la formación de dos grupos con una menor separación entre los individuos de guayaba analizados. En el cuadrante derecho superior se localiza la mayor cantidad de individuos de guayaba de color negro que corresponde a las localidades de Cerro Verde, La Soledad, El Progreso y el Junco, localidades del norte de la zona estudiada. En el cuadrante derecho inferior se encuentra la mayor cantidad de individuos de guayaba de color verde que corresponden a las localidades de Cerro Gato y Socavón, localidades hacia el sur de la zona muestreada. En el PCoA se evidencia de manera más clara como a pesar de la tendencia de agrupamiento de los individuos del norte y sur del área de estudio, las muestras de ambos grupos están mezcladas y su separación (distancia genética) es mucho menor en comparación con los individuos provenientes del continente.

Algunos de los parámetros utilizados para evaluar la diversidad genética de los individuos estudiados se presentan en la Tabla 3. El primer parámetro de análisis fue el porcentaje de polimorfismo encontrado. Para facilitar el análisis de los resultados obtenidos por medio del programa GenAlEx se estableció un promedio o un global de las 6 localidades de San Cristóbal. El porcentaje de polimorfismo en las muestras continentales fue 67% y para San Cristóbal fue 46%. En cuanto al número de alelos encontrados, en el continente se determinó un valor 17.88 y para San Cristóbal un valor de 15.21. En cuanto a alelos exclusivos, se identificó 13 en el continente y 2 en San Cristóbal. El índice de Shannon mide la biodiversidad específica en un ecosistema particular, se mide en una escala de 0 a 1, mientras más cercano a 1 es, indica mayor diversidad (Hennink y Zeven, 1990). En este estudio se obtuvo un valor de 0.285 para San Cristóbal y 0.624 para el continente. Esto indica una mayor diversidad genética en el continente, pese al bajo número de muestras utilizadas. Dentro de la isla la localidad donde se encontró la mayor diversidad genética de la guayaba fue Socavón con un índice de Shannon de 0.357.

La distancia genética de Nei permite establecer el grado de divergencia o similitud que existe entre individuos. Mientras mayor es esta distancia, los individuos están más distantes genéticamente entre sí (Hennink y Zeven, 1990). En este estudio se obtuvo distancias genéticas muy cercanas a 0, lo que indicaría poca divergencia genética entre los distintos individuos analizados. Las mayores distancias genéticas se encontraron entre los individuos del continente con individuos de la isla (la mayor distancia fue entre individuos del continente y Cerro Verde: 0.129). Entre individuos de San Cristóbal todas las distancias genéticas fueron menores a 0.1 (Tabla 4). Se intentó relacionar la distancia genética con la distancia geográfica existente entre los individuos de guayaba estudiados. Para ello se realizó un prueba de Mantel que corroboró que no existe esta relación relación ($R=0.054$, $p=0.016$) (Tabla 4). Se determinó también índices de fijación (valor F_{ST} de Wright) que describen estadísticamente el valor esperado de heterocigocidad para una población. Los valores de este índice oscilan entre 0 y 1. Un valor de 0 indica la existencia de flujo génico entre poblaciones y un valor de 1 indica que no existe flujo génico entre individuos (Bird et al., 2011). Los valores F_{ST} encontrados en este estudio fueron muy cercados a 0, lo que indica que existe un elevado flujo génico entre todos los individuos de guayaba analizados. El menor valor F_{ST} se identificó entre la población de Cerro Gato y El Progreso (0.046) (Tabla 5).

Finalmente se realizó un análisis de estructura de población, STRUCTURE. Se realizó dos análisis de estructura poblacional distintos, uno incluyendo y otro excluyendo los individuos de guayaba procedentes de las dos provincias del Ecuador continental. En la Figura 7 se observa el resultado de STRUCTURE por medio de un grafico incluyendo los individuos del continente y en la Figura 8 el resultado del STRUCTURE solamente para las 6 localidades de San Cristóbal. En las Figuras 7 y 8 se puede observar cada grupo

formado de un color diferente. Cada uno de los colores que se observan indican una línea ancestral diferente. El observar dos líneas ancestrales nos indica que el programa arroja como mejor opción la posibilidad de dos poblaciones es decir un k óptimo de dos. Ambas figuras 7 y 8 tienen un valor K óptimo de 2.

En la Figura 7 que se realizó incluyendo las muestras del continente se observa el k óptimo de 2 al observar dos grupos principales o dos líneas ancestrales que pertenecen al continente y a San Cristóbal. En la Figura se aprecia como en cada una de las zonas estudiadas predomina una línea ancestral diferente, es decir, no existe una mezcla. Debido a que no existe mezcla entre las dos líneas ancestrales encontradas se puede sugerir que la población de San Cristóbal proviene claramente de un origen distinto y distante al muestreado.

Por otro lado en la Figura 8 se observan las 6 localidades insulares muestreadas sin incluir las muestras del continente. En esta figura se puede observar nuevamente que el k óptimo es de 2. Nuevamente observamos dos líneas ancestrales y podemos observar que en este caso en todas las localidades analizadas una mezcla proveniente de ambas líneas ancestrales encontradas. Las localidades del sur de la zona de estudio (Cerro Gato y Socavón) tienen predominancia por una línea ancestral en color morado y las localidades del norte de la zona de estudio (El Junco, La Soledad, El Progreso y Cerro Verde) poseen predominancia por la otra línea ancestral en color celeste. Sin embargo, se observa una mezcla bastante pronunciado lo cual nos indica que hay bastante intercambio genética entre los dos grupos que se observan.

8. Discusión

Las Islas Galápagos son un sitio único, un laboratorio de evolución que requiere cuidados especiales y programas de conservación. Las especies introducidas representan una de las amenazas más importantes para las especies endémicas de las islas. La guayaba es una de las especies introducidas que se ha convertido en un peligro potencial para el Archipiélago (Chiriboga et al., 2006). Los estudios de diversidad genética son una herramienta para entender el estado de una especie y así llevar a cabo planes de control y manejo de la misma. Este es un estudio preliminar de diversidad genética de la guayaba en 6 localidades de la isla San Cristóbal usando marcadores microsatélites.

Se probó 23 primers homólogos para *Psidium guajava*, de los cuales 17, 74%, amplificaron exitosamente (Tabla 1). Estos 23 pares de primers habían sido ya utilizados en un estudio previo en el que se incluyó nueve variedades de guayaba (Kanupriya et al., 2011), con un 100% de amplificación. Las temperaturas de annealing reportadas por Kanupriya et al., 2011 fueron utilizadas con la mayoría de los primers en el presente estudio, sin embargo para algunos primers se tuvo que establecer la temperatura mediante PCR en gradiente (Tabla 1). Al tratarse de primers homólogos se esperaba obtener amplificación con todos los marcadores. En el estudio de Kanupriya et al. 2011 se utiliza variedades de guayaba provenientes de India. La falta de amplificación con ciertos marcadores podría ser explicada por mutaciones que han ocurrido en los sitios de amplificación de cada marcador (Reddy MP. et al. 2002). Esto podría indicar que la población de guayaba analizada en el presente estudio es distante a las variedades analizadas en el estudio de Kanupriya et al. (2011).

El total de alelos en los individuos de guayaba estudiados fue de 43, en comparación con los 147 alelos reportados en el estudio de Kanupriya et al. (2011). El bajo número de alelos reportados en este estudio en comparación al de Kanupriya et al. 2011

puede deberse a la población utilizada en cada uno de estos estudios. En el estudio de Kanupriya et al. 2011 se analizan individuos de los 9 cultivares de guayaba que se comercializan en toda India, uno de los países con más riqueza genética para este cultivo. En el presente estudio se analiza individuos de guayaba distribuidos en la zona agrícola de la isla San Cristóbal donde la guayaba fue introducida hace menos de 200 años.

Los 112 individuos de guayaba (94 de San Cristóbal y 18 del continente) utilizados en este estudio formaron 3 grupos tanto en el fenograma como en el PCoA. Uno de estos grupos está claramente separado de los otros dos y agrupa a todas las muestras del continente. La separación de los otros dos grupos es menos marcada pero se observa una tendencia de agrupación de acuerdo al lugar muestreado. Si analizamos el sur de la zona muestreada, vemos que las localidades del Socavón y Cerro Gato se agrupan mientras que las localidades de Cerro Verde, La Soledad, El Progreso y El Junco, localizadas al norte de la zona de estudio también se agrupan.

La distribución espacial encontrada para la individuos analizados donde se separan las muestras de San Cristóbal con las del continentes y a su vez que la diferenciación entre las muestras del continente sea mayor a la de los individuos de San Cristóbal se sugiere que puede ser explicada tanto por fenómenos antropológicos como por fenómenos biológicos. Si bien no se conoce sobre la historia de introducción de la guayaba se cree que fue introducida a San Cristóbal desde el Ecuador continental, por lo tanto una pequeña muestra de guayaba llegó a San Cristóbal y colonizó el lugar. Por lo tanto posiblemente, se produjo un efecto fundador con los pocos individuos que llegaron. Los pocos individuos “fundadores” del nuevo ecosistema contienen toda la información genética para esa especie en ese ecosistema (O’Brien E. et al., 1994).

La muestra de guayaba que llegó a San Cristóbal pasó por dos fenómenos importantes; un cuello de botella y un efecto fundador. Ambos fenómenos vienen de la

mano, ya que cuando se coloniza nuevos ecosistemas solamente parte de la muestra original lo consigue por lo cual pasa por el cuello de botella que reduce significativamente su heterocigocidad. Por otro lado, los individuos que lograron atravesar el cuello de botella ahora pasan por el segundo fenómeno, el efecto fundador, donde todos los individuos que lograron llegar al nuevo ecosistema poseen todo el material o pool genético para las siguientes generaciones. Ambos fenómenos tienen consecuencias similares como la disminución drástica de individuos debido a factores ambientales o antropológicos, reducción de la diversidad genética y cambios considerables en la estructura genética de la nueva población. En la Tabla 3 se observa que la heterocigosidad observada de los individuos de guayaba analizados de la isla San Cristóbal en comparación con los del continente muestra una reducción del 40%. Por otro lado, es importante revisar los registros históricos de colonización de San Cristóbal. Se piensa que la guayaba ingresó a la isla por colonos que llegan a la hacienda de Manuel J. Cobos y que la procedencia de estos colonos era principalmente de las provincias de Guayas y Loja (Latorre, 2002) (Comunicación personal Carlos Valle, Abril, 2014). Este registro histórico implicaría que la guayaba presente en San Cristóbal proviene presumiblemente de Guayas o Loja, lo cual justificaría la clara separación de la población insular analizada en comparación con la muestra continental tomada de las provincias de Manabí y Pichincha. Una ampliación de la muestra continental permitiría comprender con mayor certeza la relación de la guayaba en San Cristóbal con la guayaba del continente.

Para analizar la agrupación de la guayaba dentro de San Cristóbal es importante mencionar los resultados obtenidos en el análisis de estructura poblacional, STRUCTURE. Se realizó dos análisis de estructura poblacional. En el primero se incluyó los 112 individuos analizados (94 de San Cristóbal y los 18 del continente) y se obtuvo un k óptimo de 2 ($|\ln''(K)|=179.70$). Lo que indica dos grupos ancestrales hipotéticos. En este

análisis se observó muy poca penetrancia entre ambos grupos analizados. Es decir que no provienen de la misma línea ancestral. Lo cual se puede explicar sugiriendo que los individuos analizados de San Cristóbal no provienen del mismo origen que los individuos analizados del continente.

En un segundo análisis de estructura de la población se analizó únicamente la población dentro de San Cristóbal. Donde se evidenció la formación de dos grupos ancestrales; es decir un k óptimo de 2, ($k=2$, $|\ln''(K)|= 57.81$) pero la penetrancia entre ambos fue mucho mayor. Es decir las localidades muestreadas provienen de una mezcla de los dos las dos líneas ancestrales encontradas. Las poblaciones que tuvieron menor penetrancia de otras poblaciones fueron las de Cerro Gato y Socavón. Éstas coinciden con la formación de un grupo separado en el fenograma y el PCoA y son las localidades que se encuentran hacia el sur de la zona analizada.

Para comprender un poco los resultados obtenidos a partir de los programas estadísticos se planteó una serie de hipótesis basadas en datos biológicos e históricos que se conoce sobre San Cristóbal. Como primera hipótesis de esta agrupación encontrada en los individuos analizados se puede plantear que hubo varios sucesos de introducción de la guayaba a las Islas Galápagos (Comunicación personal Carlos Valle, Abril, 2014). Otra hipótesis es que las diferencias climáticas y de suelo en diferentes sectores de la isla podrían haber influido en la diferenciación genética de las poblaciones de guayaba asentadas en estos sectores (Comunicación personal Carlos Mena, Abril, 2014). Una tercera hipótesis podría justificar la distribución de la guayaba de acuerdo a los agentes dispersores de semilla para esta especie y la estructura de las fincas y terrenos donde se encuentra (Comunicación personal Stella de la Torre y Gunther Reich, Abril, 2014).

Del proceso de colonización de San Cristóbal se conoce muy poco. Se sabe que fue una de las primeras islas del Archipiélago en ser pobladas. La colonización de habitantes

inició alrededor de 1830 y desde allí fue creciendo. Se conoce dos grandes eventos de colonización de esta isla, uno ocurrido en 1860 y otro en 1879 relacionado con las haciendas de Cobos mientras este creaba el ingenio azucarero en la cual se cree se introdujo la guayaba (Brewington, 2011). Desde estas fechas de las primeras colonizaciones de gente hasta la actualidad han llegado a la isla cientos de colonos y turistas que de manera intencional o accidental han introducido muchas especies. Los colonos en el siglo XIX llevaban a la isla, animales y plantas con distintos fines, principalmente trabajo y alimentación. La guayaba debió ser introducida a Galápagos precisamente con fines alimenticios. Los patrones de colonización justificarían que la guayaba haya sido introducida más de una vez a la isla. Sin embargo, a pesar de que la guayaba se distribuye a lo largo de toda la isla, se observa esta formación de dos grupos dentro de la isla, la existencia de penetrancia entre ambos y la baja diversidad genética encontrada para toda la población no justifica que dos eventos de introducción sean la causa de la separación entre grupos.

Es importante analizar cómo se distribuye la guayaba en San Cristóbal. La zona agrícola de la isla está conformada por muchas fincas o haciendas, muchas de las cuáles son propiedad de un mismo dueño. Adicionalmente, muchas de estas haciendas están abandonadas y hoy en día constituyen potreros. El uso del sector agropecuario y el funcionamiento de Unidades Productivas en San Cristóbal es limitado debido al proceso de abandono de fincas sin producción. La estimación de SIPAE del 2006 dice que en esta isla un 36.4% de las fincas se encuentran abandonadas (Chiriboga et al., 2006). Esta distribución y características de las fincas en la isla es muy importante ya que se ha reportado que las fincas abandonadas son escenarios perfectos para especies invasivas como la guayaba (Velasco, M., 2002). La tasa de abandono parece estar directamente relacionada con la distribución de las especies invasivas. Se sabe que Santa Cruz presenta

menor infestación de plagas botánicas y esto se relaciona con que posee una menor tasa de abandono de fincas (13,7 %) en comparación con Isabela o San Cristóbal (Chiriboga et al., 2006). Ahora bien, en estas fincas abandonadas o subutilizadas, muchas pertenecientes a un mismo dueño, se maneja una ganadería extensiva de más de 5 cabezas de ganado por hectárea (Chiriboga et al., 2006). El ganado y los caballos constituyen la principal forma de dispersión de guayaba en San Cristóbal (De la Torre, S., in prep.). Se ha demostrado también que el mayor éxito de germinación para las semillas de guayaba ocurre para aquellas que son excretadas en las heces de estos mamíferos. Entender esta forma de dispersión de la guayaba es clave para comprender su distribución en la isla. Los mamíferos grandes se mueven largas distancias, mucho más si se considera que los caballos son un dispensable medio de transporte para los habitantes de la zona. Si varias fincas aledañas pertenecen al mismo dueño es incluso más comprensible que los animales se distribuyan por todo este terreno. De esta manera, a pesar de que exista una separación de la guayaba de las localidades del sur de la zona agrícola analizada (Socavón y Cerro Gato) con las del norte de la zona agrícola analizada (El Progreso, La Soledad, El Junco y Cerro Verde); el movimiento de semillas por parte de los animales justificaría la penetrancia y mezcla de los individuos analizados que se evidencia en los análisis estadísticos realizados. Es decir, las localidades no están separadas, existe mucho flujo génico que justifica la estructura genética de la población pese a una posible separación norte-sur del área analizada de base y que puede estar explicada por factores ecológico-ambientales.

Los factores ambientales de la isla cumplen un factor importante para la agrupación que se observa tanto en el fenograma como en el PCoA y en el STRUCURE. El clima en el Archipiélago está muy influenciado por las corrientes marinas: la corrientes frías de Humbolt que viene del Sur y la de Cromwell que viene del Este determinan una época de

garúa entre mayo y noviembre. La corriente cálida de El Niño que proviene del Norte, determina una época cálida con presencia de fuertes lluvias de diciembre a abril. La humedad en San Cristóbal es un factor muy importante a considerar. La isla está situada al Sureste del Archipiélago por lo que tiene mayor influencia de vientos cargados de humedad en la parte sur de la isla (Chiriboga et al., 2006).

San Cristóbal constituye una de las islas más antiguas en el Archipiélago y por esta razón el suelo ha estado más años en contacto con la lluvia, formándose suelos más profundos y ricos en nutrientes. Por otro lado San Cristóbal representa la isla que posee recursos hídricos más abundantes de agua dulce, lo cual favorece a la agricultura y al desarrollo turístico de la isla (Chiriboga et al., 2006).

Si analizamos las 6 localidades de San Cristóbal de donde se tomaron las muestras de guayaba para este estudio, las características de cada una de ellas pueden corroborar la idea de la agrupación que se observa para las localidades del sur y las del norte del área en estudio. Por un lado, tenemos a las localidades de Socavón y Cerro Gato situadas en el Sur. Cerro Gato es considerada zona de abandono, ésta cubre una extensión de más de 20% de la zona agropecuaria de la isla y se encuentra entre 200 y 250 msnm. Es una zona húmeda y caliente donde solo subsisten algunas fincas ganaderas de gran tamaño. Esta zona fue densamente poblada antiguamente (Chiriboga et al., 2002). El Socavón por otro lado cubre una área del 15% de la zona agropecuaria y se la considera la zona cafetera y se encuentra entre 190 y 270 msnm. Las características ambientales y de humedad son comunes para ambas localidades, lo cual puede justificar la agrupación entre los individuos de guayaba recolectados de ambos sitios.

Por otro lado tenemos a las localidades de El Progreso, La Soledad, Cerro Verde y El Junco que aunque no comparten características tan similares como las dos localidades descritas anteriormente, los resultados parecen agruparlas. La zona de El Progreso se

considera en vía de urbanización, El Junco es zona ganadera, Cerro Verde zona hortícola y La Soledad limita con localidades de ganadería, cafetales. Es una zona considerada de expansión urbana que aún no está bien clasificada (Chiriboga et al., 2006). Al observar la Figura 1, se distingue claramente las localidades del sur (Socavón y Cerro Gato). Sin embargo, El Junco y Cerro Verde, aunque se agrupan con las localidades del norte parecerían ser más localidades intermedias que podrían servir de intercambio de material genético, siendo este un punto medio para los dispersores que viajen del sur al norte de la zona agrícola analizada como medio de transporte de personas y carga. El Junco se caracteriza por ser más seco y encontrarse sobre los 400 msnm. Cerro Verde por su lado se caracteriza por la presencia de mayor concentración de garúa que cualquier otra localidad y se encuentra entre 200 y 270 msnm. Algunos datos de distribución de la guayaba señalan que la guayaba podría haber sido sembrada inicialmente en Cerro Gato y Socavón y desde allí haberse dispersado hacia otras zonas de la isla (Comunicación personal Hugo Valdebenito, Abril, 2014).

Factores ambientales y ecológicos como la humedad, altura y disponibilidad de nutrientes en el suelo habrían contribuido a la diferenciación genética entre los asentamientos en las diferentes zonas agrícolas estudiada. Finalmente, factores antropológicos como estructura de las haciendas, movimiento intencional de las plantas y movimiento de las semillas por el ganado justificarían la penetrancia e intercambio genético entre individuos de la zona agrícola. Este estudio revela la importancia y el interés de estudiar la diversidad genética y los patrones de dispersión de una especie invasiva en un ecosistema insular. Las características particulares de estos ecosistemas, los convierten en lugares ideales para comprender como la combinación de diferentes factores conlleva al establecimiento de estructuras poblaciones interesantes, como es el caso de la guayaba en San Cristóbal.

9. Conclusiones

Se pudo identificar un alto nivel de diversidad genética de la guayaba en los individuos analizados del continente y una diversidad genética menor en los individuos de guayaba colectados en la isla San Cristóbal.

Se obtuvo amplificación para 17 de las 23 combinaciones de primers ensayadas (74%). Con las 17 combinaciones se encontró 43 alelos en las 112 muestras analizadas.

No se encontró correlación entre la distribución geográfica y la distancia genética entre los individuos de guayaba analizados en este estudio.

Factores ambientales y antropológicos podrían explicar preliminarmente la distribución y diversidad genética de la guayaba en la isla San Cristóbal.

Se observó una separación de los individuos de guayaba en San Cristóbal en dos grupos. Un grupo ubicado al sur de la zona en estudio (formado por localidades de Socavón y Cerro Gato) y un grupo hacia el norte de la zona en estudio formado por las localidades de Cerro Verde, El Junco, El Progreso y La Soledad).

10. Recomendaciones

Incluir más individuos de guayaba de otras localidades de San Cristóbal, de otras islas del Archipiélago y aumentar el número de provincias del Ecuador continental para poder establecer una mejor estructura poblacional.

Incluir más número de muestras de guayaba por localidad en la isla y en el continente para abarcar un número mayor de individuos y poder establecer mejor una distribución por medio de un Análisis de Coordenadas Principales.

Incluir en el estudio individuos de Guayas y Loja ya que de acuerdo a datos históricos muchos de los primeros habitantes provenían de estas provincias.

Tomar datos de las zonas de estudio como suelo, temperatura, altitud, etc., para analizar de manera mas completa el impacto de la guayaba como especie invasiva.

Analizar de manera más profunda la biología de la guayaba y sus dispersores para entender y corroborar con la distribución encontrada preliminarmente en este estudio.

Comparar los resultados obtenidos en este estudio realizando una investigación de diversidad genética con el guayabillo, especie nativa de Galápagos para ver si han ocurrido procesos de hibridación.

11. Bibliografía

Benbouza H., Jacquemin J. M., Baudoin J. P. and Mergeai G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc Environ* 10: 77-81.

Bensted-Smith R. (ed). (2002). A biodiversity vision for the Galapagos Islands. Charles Darwin Foundation & World Wildlife Fund, Galapagos, Ecuador.

Besnard, G; Wille, P; Cooke, D. y Chapuis E. 2007. On the origin of the invasive olives (*Olea europaea* L., Oleaceae). *Heredity* 99: 608-619.

Bird, CE, Karle, SA, Smouse, PE y Toonen, RJ. (2011). Detecting and measuring genetic differentiation. *CrustISSUES* 19 29: 31

Bonilla, L. Cultivo de Guayaba. Boletín técnico No. 8, Fundación de Desarrollo Agropecuario, Inc. pp. 1-13.

Brewington, L. 2011. The Politics of Invasion: Defining and Depending on the Natural, Native and Legal in the Galápagos Islands of Ecuador. Chapel Hill.

Caraballo, B.M. 2001. Biología floral del guayabo (*Psidium guajava* L.) en la Planicie de Maracaibo, Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*, 18: 41-55.

Chiriboga, R; Fonseca B y Maignan S. 2006. Desarrollo de políticas y estrategias de manejo del sector Agropecuario y su relación con las especies introducidas en la Provincia de Galápagos. Proyecto ECU/00/G31. pp: 1-86.

Cubero. Jose. 2002. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Mundi Prensa. Madrid pp 70-80.

de la Torre S., Villarruel I. in prep. Efectos del uso del suelo sobre la dinámica de nutrientes y estructura de la comunidad de invertebrados edáficos en San Cristóbal, Galápagos.

Diario El Universo (2013). Galápagos lucha por erradicar la mora y la guayaba. Obtenido el 25 de Abril, 2014 de <http://www.eluniverso.com/noticias/2013/06/06/nota/998571/galapagos-lucha-vegetacion-autoctona-introducida>

Erlich, H. 1989. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, Vol. 9, No. 6.

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.

Frankham, R. 1997. Do Island populations have less genetic variation than mainland populations?. *Heredity* 78: 311-327.

Glover, D.E y Barret, S.C.H. Genetic variation in continental and island population of *Eichomia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 59: 7-17

Goltsman, M., Kruchenkova, E.P., Sergeev, S., Volodin, I., y Macdonald, D.W. (2005). 'Island syndrome' in a population of Arctic foxes (*Alopex lagopus*) from Mednyi Island. *J. Zool.* 267, 405–418

Hamann O. (1991). Indigeous and alien plants in the Galápagos Islands: problems of conservation and development. In: *Tropical Botanic Gardens: their role in conservation and development.* pp. 169-192. London: Academic Press.

Hennink, S. y Zeven, AC. (1990). The Interpretation of Nei and Shannon. Weaver within popupation variation indices. *Euphytica* 51: 235-240.

Iovanna R., Vance C. (2007). Modeling of continuous-time land cover change using satellite imagery: an application from North Carolina. *Journal of Land Use Science* 2(3): 147-166.

Itow S. (2003). Zonation pattern, succession process and invasion by aliens in species-poor insular vegetation of the Galápagos Islands. *Global Environmental Research*, vol. 7(1):39- 58.

Jäger, H; Tye A y Kowarik I. 2007. Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galápagos. *Biological Conservation* 140, pp: 297-307.

Jakobsson, M. y Rosenberg, N.A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with the label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.

Kanupriya; Madhavi Latha, P; Aswath, C; Laxman Reddy; Padmakar, B; Vasugi, C y Dinesh, M.R. 2011. Cultivar Identification and Genetic Fingerprinting of Guava (*Psidium guajava*) Using Microsatellite Markers. *International Journal of Fruit Science*, 11:2, 184-196.

Kuo, C.H y Janzen, F.J. (2003). bottlesim: a bottleneck simulation program for long-lived species with overlapping generations. *Molecular Ecology Notes* 3: 669-673.

Latorre, O. (2002). Manuel J. Cobos, su vida y su obra.

Lee, C. 2002. Evolutionary genetics of invasive species. *TRENDS in Ecology and Evolution* Vol. 17 No. 8.

O'Brien, E., Kerber, RA., Jorde, LB y Rogers, AR. (1994). Founder Effect: Assessment of Variation in Genetic Contributions among Founders. *Human Biology* 66: 185-204.

Peakall, R. and Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.

Perrier, X., and J. P. Jacquemoud-Collet. 2006. DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/>.

Powell, W; Gordon, C; Machray y Provan, J. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *PII S1360-1385(96)* Vol.1, No. 7.

Pritchard, JK., Wen, W., and D. Falush (2004) Documentation for structure software:Version2.3
http://pritchardlab.stanford.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf

Ramanatha Rao, V y Toby Hodgkin. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant resources. *Plan cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19

Randell, R; Howarth, D. y Morden, C. 2004. Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawai'i. *Conservation Genetics* 5: 217-230.

Reddy, MP., Sarla, N. y Siddiq, EA. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128:9-17.

Risterucci, A.M; Duval, F; Rohde, W y Billotte, N. 2005. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes* 5, 745-748.

Rodríguez, N; Valdés-Infante, J; Becker D; Velázquez, B; González G; Sourd, D; Rodríguez J; Bilotte, N; Risterucci, A.M; Ritter, E y Rohde, W. 2007.Characterization of Guava Accessions by SSR Markers, Extension of the Molecular Linkage Map, and

Mapping of QTLs for Vegetative and Reproductive Characters. *Acta Hort.* 735, ISHS: 201-216.

Shagai-Marooof M, Soliman K, Jorgensen R and Allard R. (1984). Ribosomal DNA spacer- length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.

Tye A. (2002). Revisión del estado de amenazas de la flora endémica de Galápagos. *Informe Galápagos 2001-2002*. pp: 116-122. . Fundación Natura.

Valdés-Infante, J; Rodríguez, N. N; Becker, D; Velázquez, B; Sourd, D; Espinosa, G; Rohde, W. 2007. Microsatellite Characterization of guava (*Psidium guajava*) Germoplasm Collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, vol. 28, núm 3, pp. 61-76.

Velasco, M. (2002). Percepciones de la población de Galápagos sobre las especies introducidas y el Sistema de Inspección y Cuarentena para Galápagos (SICGAL). *Parque Nacional Galápagos y Fundación Charles Darwin*.

Walsh S.J., Mc Cleary A., Mena C.F., Shao C., Tuttle Y., González J.P, Atkinson R. (2007). QuickBird and Hyperion Data Analysis of an Invasive Plant Species in the Galapagos Islands of Ecuador: Implications for Control and Land Use Management. *Special Issue on Earth Observation for Biodiversity and Ecology. Remote Sensing of Environment*, Douglas M. Muchoney, Senior Scientific Expert, GEO Secretariat, Gues

12. Tablas

Tabla 1. Primers microsatélites utilizados para la amplificación de muestras de guayaba. Kanupriya et al. 2011

Número	Loci	Secuencia de Primes (5'-3')	T. de annealing (C)	No. de alelos	Tamaño encontrado
1	mPgCIR01	F: TAGTGCTTTGGTTGCTT R: GCAGGTGGATATAAGGTC	52	1	240-260
2	mPgCIR02	F: AGTGAACGACTGAAGACC R: ATTACACATTGAGCCACTT	55	1	210-220
3	mPgCIR05	F: GCCTTTGAACCACATC R: TCAATACGAGAGGCAATA	55	4	240-270
4	mPgCIR07	F: ATGGAGGTAGGTTGATG R: CGTAGTAATCGAAGAAATG	55	3	130-160
5	mPgCIR08	F: ACTTTCGGTCTCAACAAG R: AGGCTTCCTACAAAAGTG	55	3	220-250
6	mPgCIR09	F: GCGTGTGCTATTGTTTC R: ATTTTCTTCTGCCTTGTC	55	2	160-180
7	mPgCIR10	F: GTTGGCTCTTATTTGGT R: GCCCATATCTAGGAAG	55	4	260-310
8	mPgCIR11	F: TGAAGACAACAACGAG R: TTACACCCACCTAAATAAGA	55	2	250-270
9	mPgCIR13	F: CCTTTTTCCCGACCATTACA R: TCGCACTGAGATTTTGTGCT	55	3	240-260
10	mPgCIR14	F: TAAACACAACAAGGGTCA R: CAGTTTTTCATATCGTCCTC	55	1	190-210
11	mPgCIR17	F: CCTTTCGTCATATCACTT R: CATTGGATGGTTGACAT	55	4	240-260
12	mPgCIR18	F: TAAGCTGCATGTGTGC R: ATGGCTTTGGATGAAA	55	3	190-210
13	mPgCIR19	F: AAAATCCTGAAGACGAAC R: TATCAGAGGCTTGCATTA	52	1	240-270
14	mPgCIR21	F: TGCCCTTCTAAGTATAACAG R: AGCTACAAAACCTTCTAAA	55	3	140-170
15	mPgCIR22	F: CATAAGGACATTTGAGGAA R: AATAAGAAAGCGAGCAGA	55	3	240-270
16	mPgCIR25	F: GACAATCCAATCTCACTTT R: TGTGTC AAGCATAACCTTC	55	3	100-140
17	mPgCIR26	F: CTACCAAGGAGATAGCAAG R: GAAATGGAGACTTTGGAG	52	3	190-240

Tabla 2. Número de muestras de guayaba colectadas por localidad. Concentración máxima obtenida de ADN a partir de la extracción.

Localidad	Hacienda	Código	Cuantificación ng/ul
Cerro Verde	Angel Alvarado	CV1	1150.3
		CV2	701.4
		CV3	537.7
		CV4	914.5
		CV5	462.8
	Buena Esperanza	CV6	798.3
		CV7	925.4
		CV8	612.3
		CV9	850.2
		CV10	548.4
	Maximo Becerra	CV11	1662.7
		CV12	539.2
		CV13	510.9
		CV14	796.1
		CV15	559.3
		CV16	877.7
El Progreso	Braulio Pallo	EP1	999.5
		EP2	1004.7
		EEP3	671.3
		EP3	823.9
		EP4	533.4
	Gato Ortiz	EEP4	529.2
		EP5	800.3
		EP6	1162.1
		EEP5	1827.5
		EP7	916.9
	Miguel Guerrero	EP8	579.6
		EEP6	165.4
		EP9	196
		EP10	392.9
EEP7		306.8	
La Soledad	Cristobal Pallo	LS1	458.9
		LS2	233
		LS3	402.4
		LS4	371.5
		LS5	250.2
	Fernando Criollo	LS6	270.3
		LS7	75
		LS8	215.1
		LS9	51.7
		LS10	227.6

		LS11	360.9
		LS12	501.1
	Hacienda la Tranquila	LS13	989.6
		LS14	357.6
		LS15	269.2
El Junco	Guido Rocillo	EJ1	118.4
		EJ2	420.2
		EJ3	869.2
		EJ4	584
		EJ5	408.5
	Juan Matapunelio	EJ6	1481.4
		EJ7	406.5
		EJ8	1117.9
		EJ9	919
		EJ10	926.5
		EJ11	891.6
	Tito C.	EJ12	430.1
		EJ13	521.7
		EJ14	226.2
		EJ15	558.4
		EJ16	417.5
		EJ17	1152.6
		EJ18	477.6
El Socavon	Centro Agricola	SV1	471.7
		SV2	1201.2
		SV3	1418.3
		SV4	834
		SV5	1285.7
	Esperanza Criollo	SV6	620
		SV7	826.5
		SV8	1017.6
		SV9	188.3
		SV10	693.1
	Hacienda Gonzales	SV11	623.7
		SV12	327.7
		SV13	229.1
		SV14	676.7
		SV15	886
Cerro Gato	Jorge Chuquimarca	CG1	2703
		CG2	1210.4
		CG3	472.1
		CG4	1440.8
		CG5	517.6
	Jaime Ricaurte	CG6	254

		CG7	698.7
		CG8	483.8
		CG9	483.7
		CG10	341.2
	Milton Aguas	CG11	303.7
	Milton Aguas	CG12	999.7
	Milton Aguas	CG13	183.8
	Milton Aguas	CG14	3888.1
	Milton Aguas	CG15	358.4
Continente	Manabí	CO1	353.17
		CO2	1396.31
		CO3	5310
	Pedernales	CO4	712.56
		CO5	4871.11
		CO6	1014.93
		CO7	571.87
		CO8	1140.99
		CO9	5102.7
		CO10	2002.94
		CO11	1127.76
		CO12	277.93
		CO13	276.99
		CO14	4349.79
		CO15	239.64
		CO16	274.15
		CO17	4460.46
		CO18	4953.62

Tabla 3. Parámetros de diversidad genética de individuos de guayaba en 6 localidades de la isla San Cristóbal y de individuos del continente.

Localidad	No. Alelo por población	No. Alelos exclusivos	% Polimorfismo	Ho	He	I
Cerro Verde	15.706 ± 0.294	0	41	0.143 ± 0.053	0.164 ± 0.053	0.257 ± 0.082
El Progreso	14.588 ± 0.412	0	47	0.167 ± 0.052	0.192 ± 0.053	0.299 ± 0.083
La Soledad	14.647 ± 0.353	0	47	0.166 ± 0.064	0.158 ± 0.049	0.247 ± 0.075
El Junco	17.412 ± 0.588	0	47	0.143 ± 0.054	0.163 ± 0.052	0.255 ± 0.079
Cerro Gato	14.412 ± 0.588	1	47	0.137 ± 0.046	0.187 ± 0.056	0.299 ± 0.089
Socavón	14.529 ± 0.471	0	47	0.166 ± 0.060	0.226 ± 0.064	0.357 ± 0.102
Global San Cristóbal	15.215 ± 1.174	2*	46	0.153 ± 0.014	0.181 ± 0.025	0.285 ± 0.041
Continente	17.882 ± 0.118	13	71	0.252 ± 0.065	0.365 ± 0.065	0.624 ± 0.112
*Alelo exclusivo de Cerro Gato + 1 alelo encontrado en todas las localidades de San Cristóbal y que se encuentra ausente en el continente						

Ho= Heterocigosidad observada

He= Heterocigosidad esperada

I= Índice de Shannon

Tabla 4. Distancias genéticas de Nei (debajo de la diagonal) y distancias geográficas (por encima de la diagonal en km) en las 6 localidades de la isla San Cristóbal y los individuos del continente.

Localidad	Cerro Verde	El Progreso	La Soledad	El Junco	Cerro Gato	Socavón	Localidad
Cerro Verde		12.130	11.11	4.09	5.390	11.280	Cerro Verde
El Progreso	0.043		1.394	8.484	7.784	2.300	El Progreso
La Soledad	0.042	0.002		7.311	7.179	3.380	La Soledad
El Junco	0.021	0.007	0.002		8.349	9.135	El Junco
Cerro Gato	0.060	0.014	0.018	0.030		7.294	Cerro Gato
Socavón	0.043	0.016	0.022	0.027	0.005		Socavón
Continente	0.159	0.146	0.154	0.150	0.143	0.100	Continente
	Cerro Verde	El Progreso	La Soledad	El Junco	Cerro Gato	Socavón	

Tabla 5. Valores del F_{st} de Wright para los 17 loci polimórficos en las 6 localidades de la isla San Cristóbal. Este índice mientras más cercano a 0 indica que existe flujo génico, y mientras más cercano a 1 indica que no existe flujo génico. Los valores para las 6 localidades de San Cristóbal son muy bajo y cercano a 0 lo cual indica que existe flujo génico entre los individuos de las localidades analizadas.

Columna1	Cerro Verde	El Progreso	La Soledad	El Junco	Cerro Gato	El Socavon
Cerro Verde	0.000					
El Progreso	0.080	0.000				
La Soledad	0.080	0.033	0.000			
El Junco	0.052	0.031	0.023	0.000		
Cerro Gato	0.100	0.046	0.051	0.066	0.000	
El Socavon	0.083	0.051	0.058	0.062	0.029	0.000

13. Figuras

Figura 1. Mapa geo referenciado de las 6 localidades de muestreo y zonificación de las localidades muestreadas en la Isla San Cristóbal, Ecuador. Programa utilizado para la creación del mapa ArcMap. Fuente: UNIGIS. Mapa elaborado por: Richard Resl-USFQ

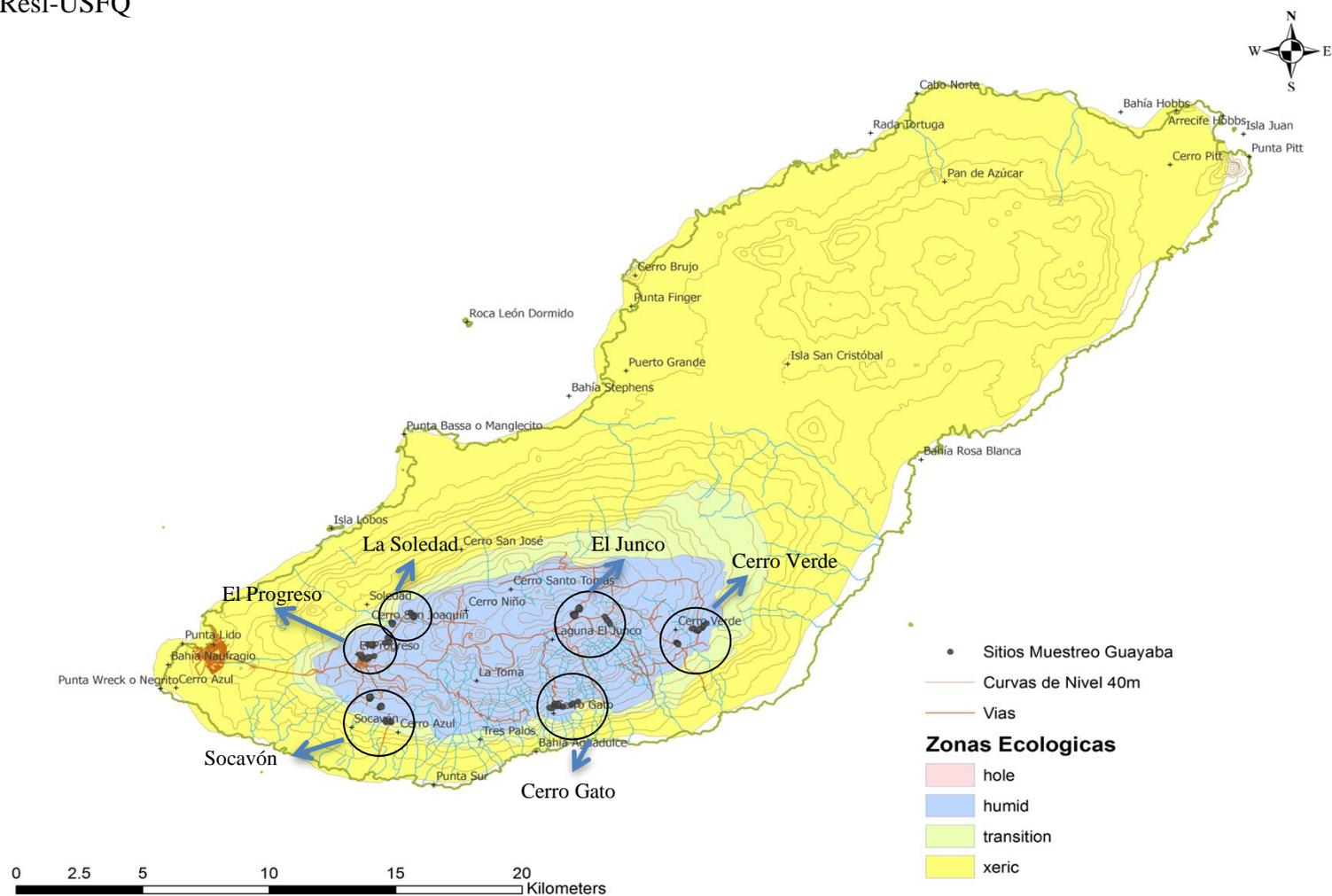


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de ADN genómico de 6 muestras de guayaba de 3 localidades de la Isla San Cristobal. Se observa de izquierda a derecha el Ladder 100bp (Invitrogen) seguido por 6 muestras de diferentes localidades de la isla (Cerro Verde, El Progreso y El Junco).

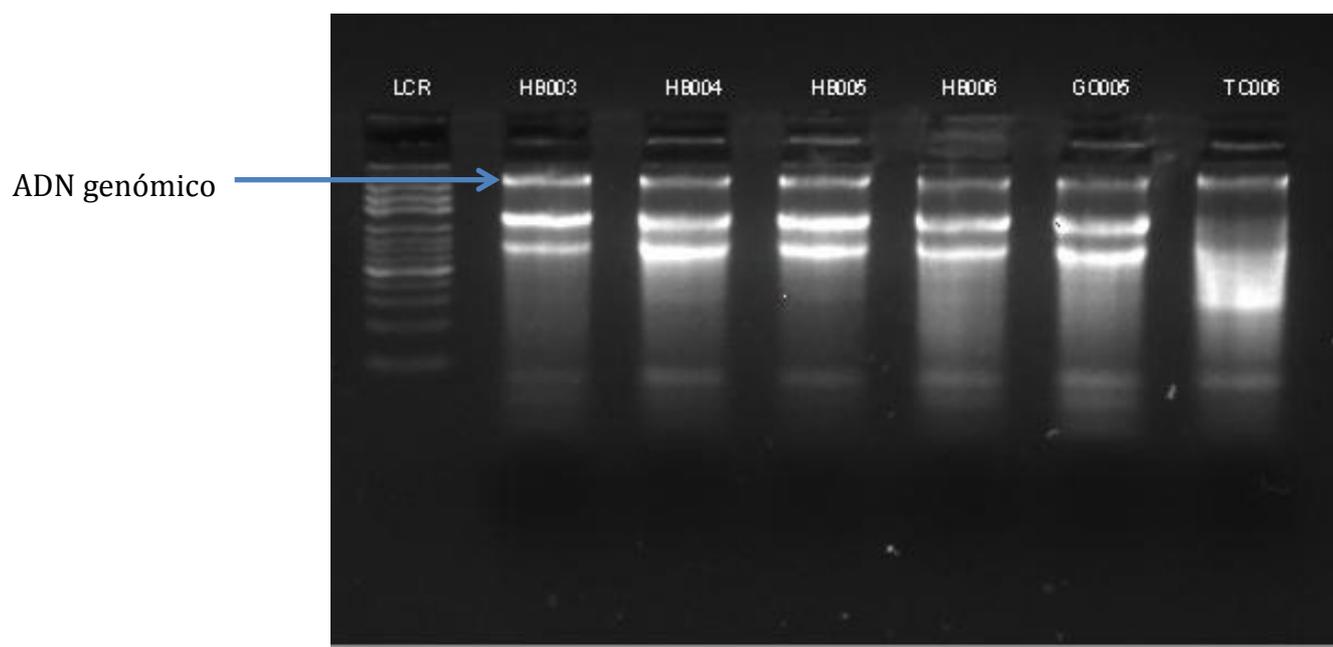
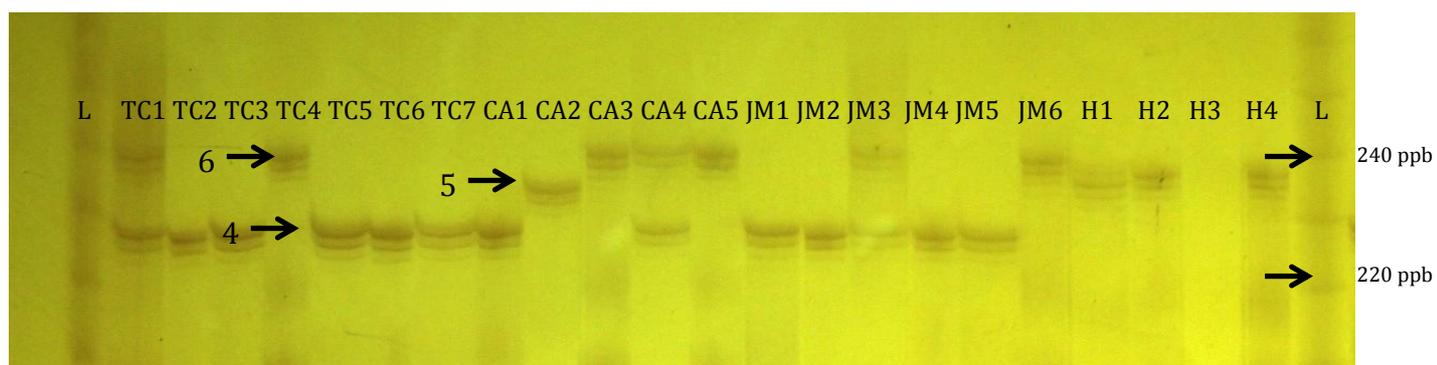


Figura 3. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el Primer 17 en 22 muestras de ADN de guayaba de las localidades El Junco, El Socavón y el continente. Se observa un total de 3 alelos. La temperatura de annealing para este primer es de 55 grados centígrados.



L = Ladder 10 bp (Invitrogen)

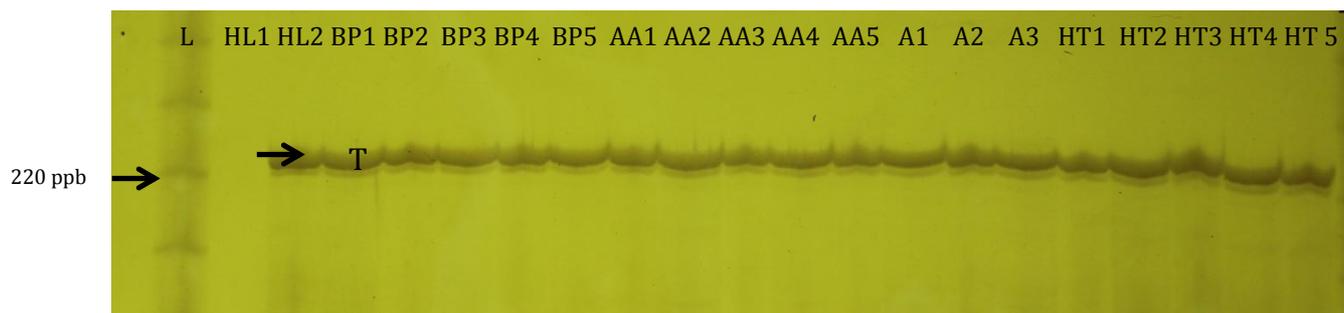
TC1-TC7= Muestras de El Junco (EJ12-EJ18)

CA1-CA5= Muestras de El Socavón (SV1-SV5)

JM1-JM6= Muestras de El Junco (EJ6-EJ11)

H1-H4= Muestras del continente (CO4-CO7)

Figura 4. Electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% de los productos de amplificación con el Primer 2 en 20 muestras de ADN de guayaba de las localidades de Cerro Verde, El Progreso, La Soledad y el continente. Se observa un solo alelo, primer monomórfico. La temperatura de annealing para este primer es de 55 grados centígrados.



L= Ladder 10 bp (Invitrogen)

HL1-HL2= Muestras del continente (CO17-CO18)

BP1-BP5= Muestras de Cerro Verde (CV6-CV10)

AA1-AA1= Muestras de El Progreso (EP1-EP5)

A1-A3= Muestras del continente (CO1-C03)

HT1-HT5= Muestras de La Soledad (LS11-LS15)

Figura 5. Fenograma realizado a partir de la matriz de distancia con las 112 muestras de guayaba, usando el programa DARwin 5.0 mediante el método de inferencia Neighbor Joining (unweighed). Se observa la formación de 3 grupos de los cuales 2 (2 y 3) contienen muestras de las 6 localidades de la Isla San Cristóbal y un solo grupo (1) muestras del continente.

Continente en color rojo (1); Cerro Gato y El Socavón, Sur de la de zona analizada, en color verde (2); El Progreso, La Soledad, Cerro Verde y El Junco, Norte de la zona analizada, en color negro (3).

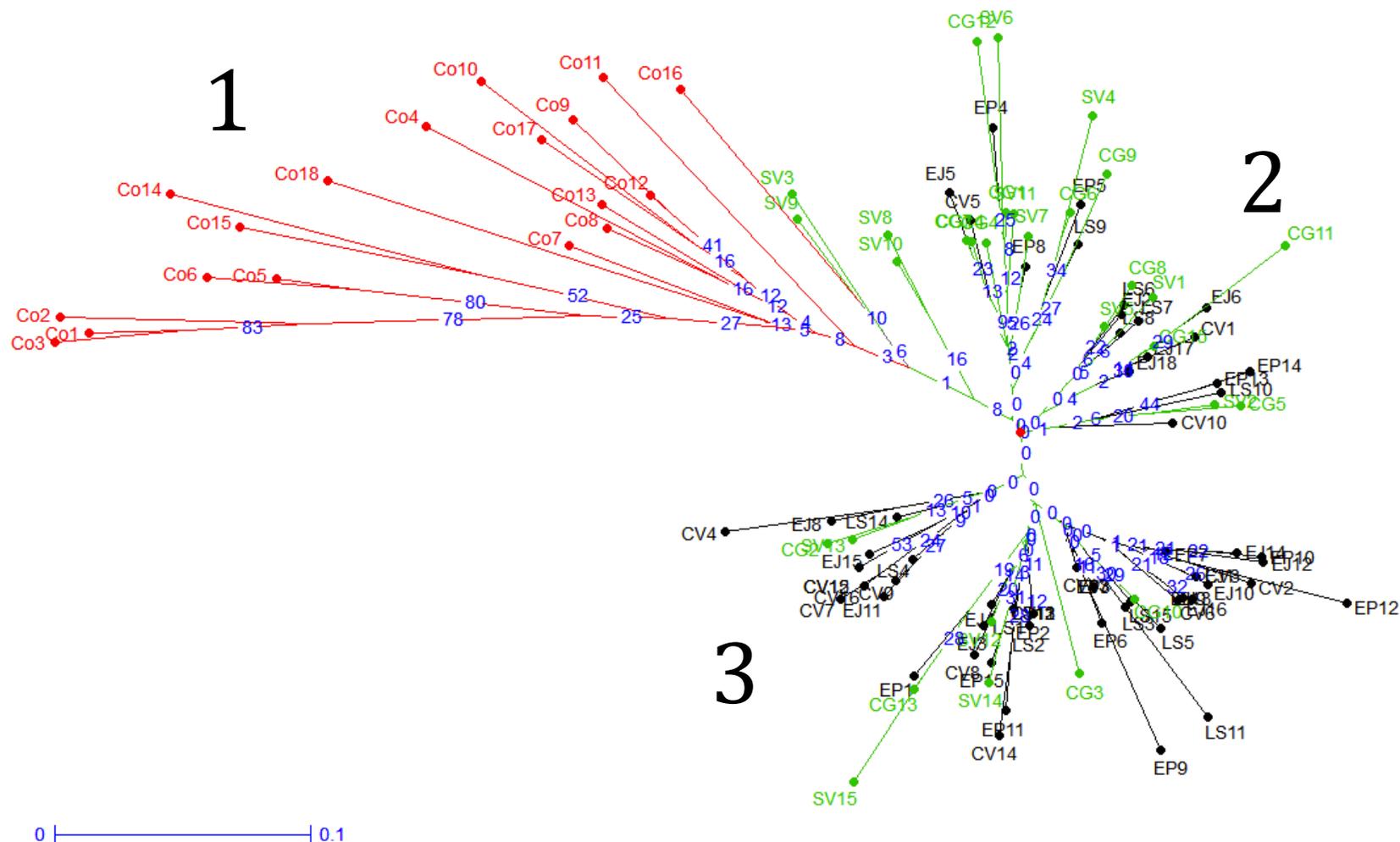


Figura 6. PCoA obtenido a partir de la matriz de distancias genéticas con datos de las 112 muestras de guayaba de las 6 localidades de la Isla San Cristóbal y la muestra del continente, utilizando el programa DARwin 5.0. Se observa en el cuadrante izquierdo y de manera agrupada las muestras del continente (color rojo). En los cuadrantes derechos se encuentran las muestras de la isla San Cristóbal (color verde: El Socavón y Cerro Gato, color negro: El Junco, El Progreso, La Soledad y Cerro Verde).

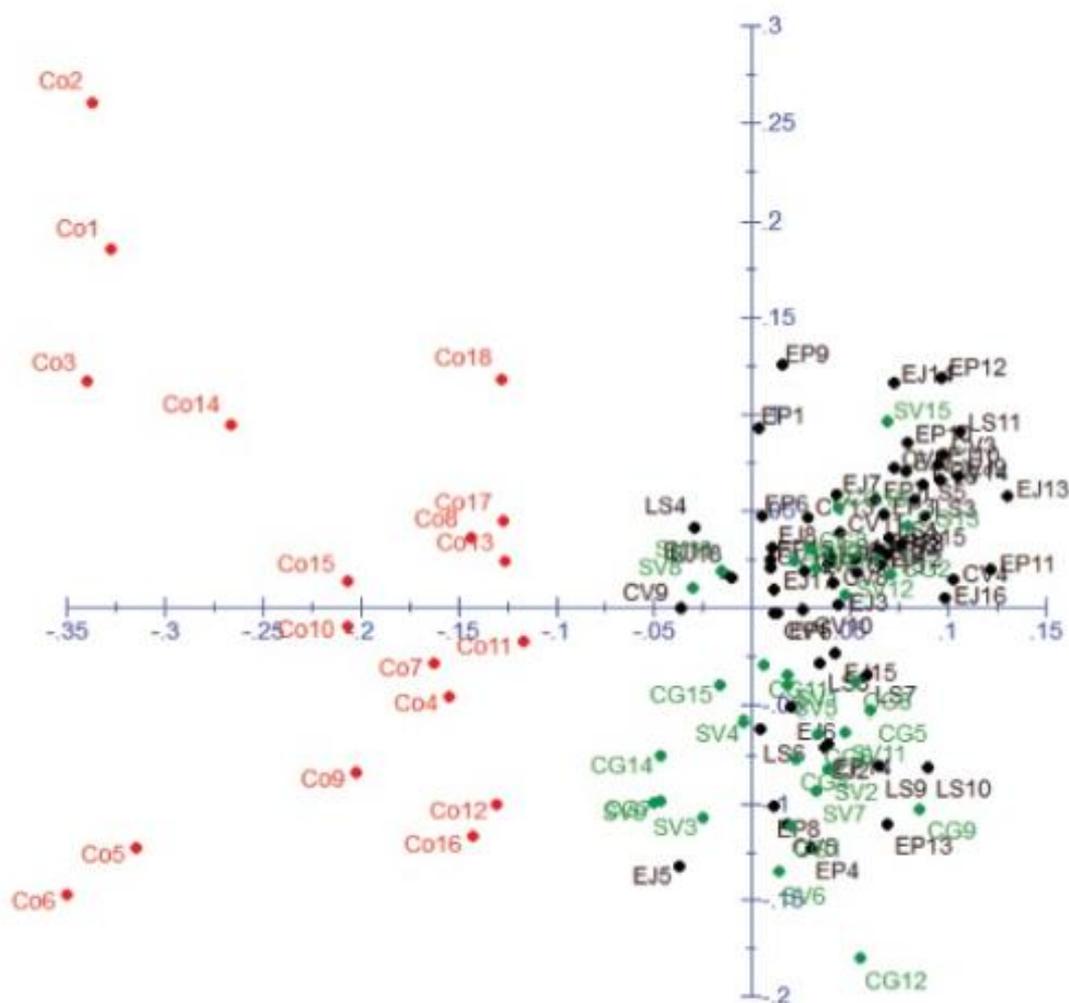


Figura 7. Grafico obtenido a partir del programa STRUCTURE. Se observan dos colores correspondientes al número de grupos ancestrales obtenidos o al valor óptimo de $k = 2$. Para este análisis se incluyo los 112 individuos.

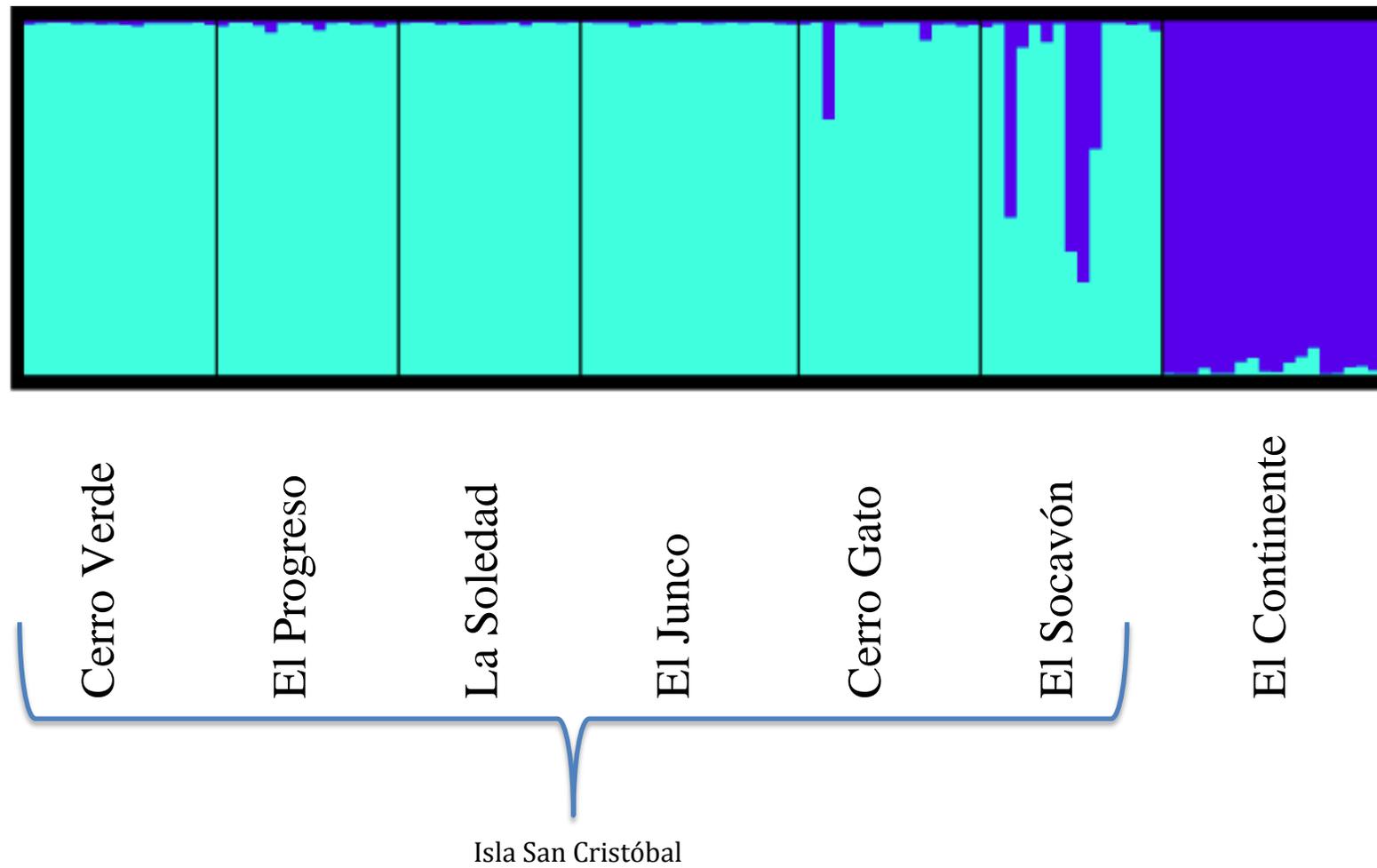


Figura 8. Grafico obtenido a partir del programa STRUCTURE. Se observan dos colores correspondientes al número de grupos ancestrales obtenidos es decir al valor óptimo de k obtenido = 2. Para este análisis se incluyo únicamente los 94 individuos de las 6 localidades de la isla San Cristóbal.

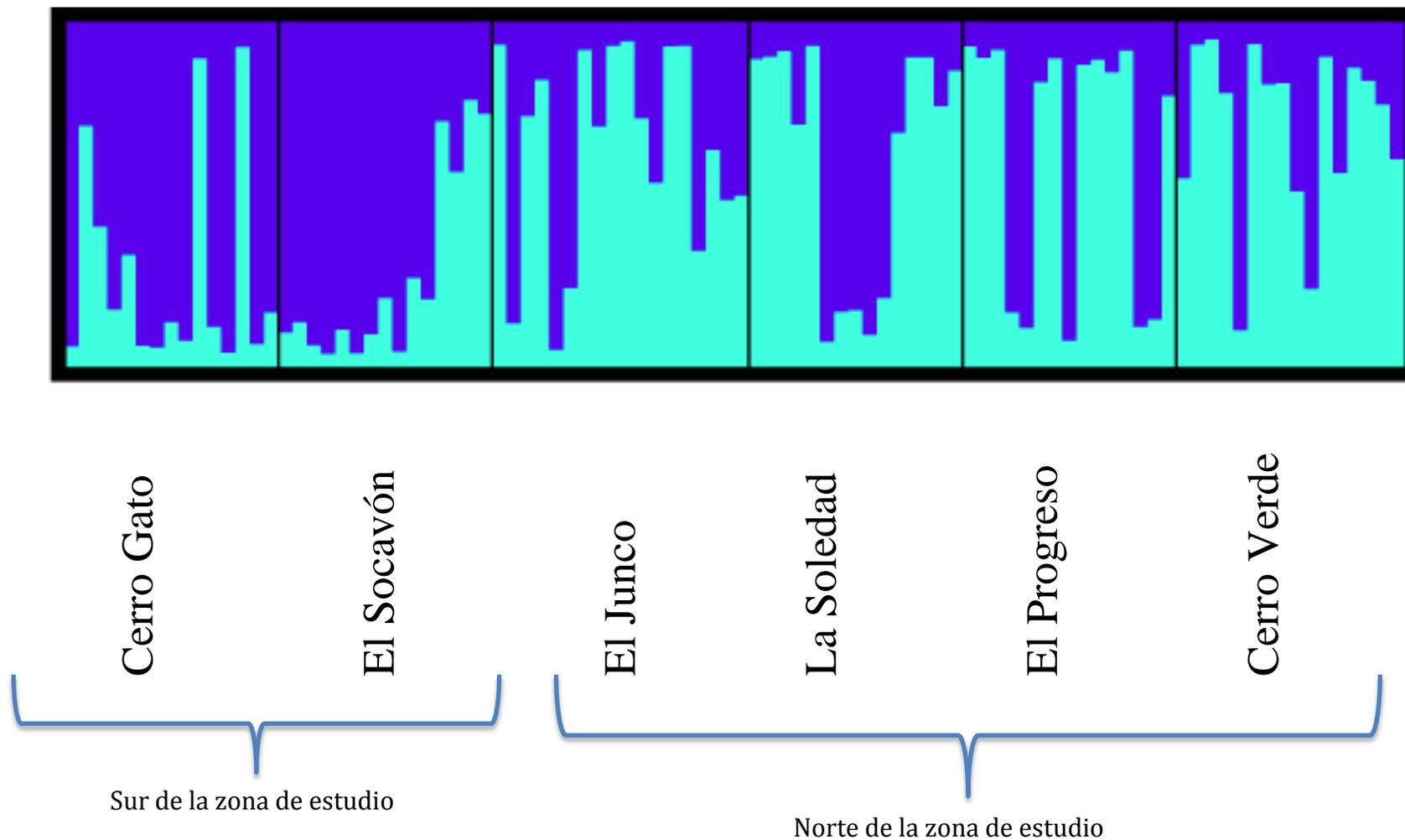
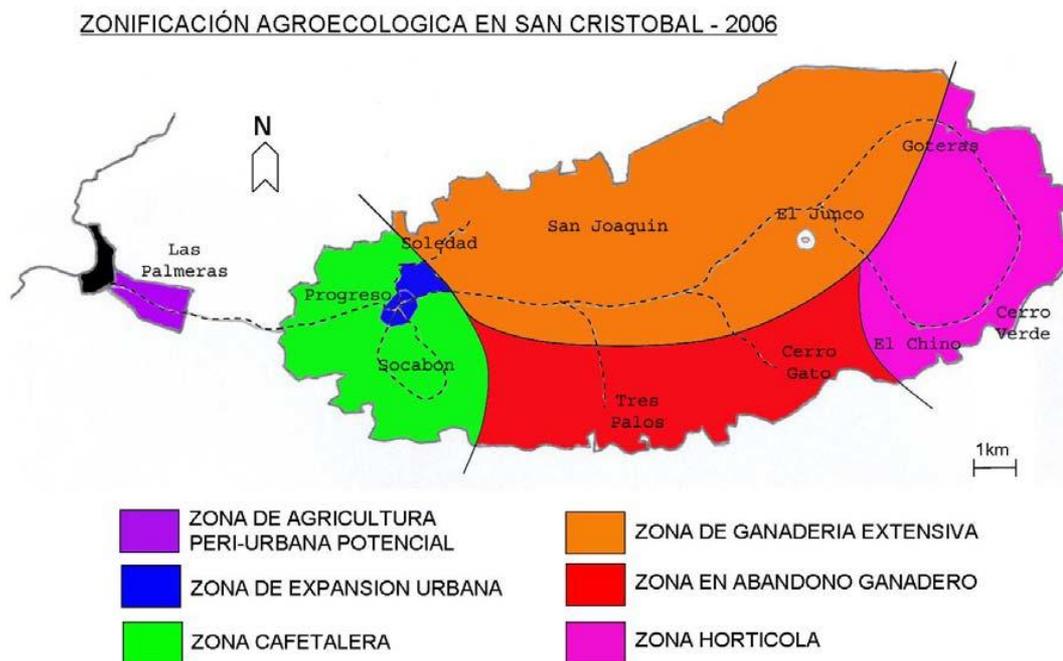


Figura 9. Zonificación agroecológica en San Cristóbal 2006. Obtenido del Proyecto ECU/00/G31 de zonificación agroecológica de las zonas agropecuarias en relación con las especies invasoras.



14. Anexos

Anexo 1. Tabla de las muestras de las 6 localidades de la isla San Cristóbal y sus respectivas posiciones geo referenciadas.

Fecha	Localidad	Hacienda	Código Hcd.	Código Loc.	Coordenadas	msnm
29/10/12	Cerro Verde	Angel Alvarado	Aa001	CV1	S0 54.003 W89 26.727	964 ft
29/10/12	Cerro Verde		Aa002	CV2	S0 53.971 W89 26.710	999 ft
29/10/12	Cerro Verde		Aa003	CV3	S0 53.989 W89 26.680	940 ft
29/10/12	Cerro Verde		Aa004	CV4	S0 54.001 W89 26.673	988 ft
29/10/12	Cerro Verde		Aa005	CV5	S0 54.010 W89 26.670	948 ft
29/10/12	Cerro Verde	Buena Esperanza	Be001	CV6	S0 53.700 W89 26.244	835 ft
29/10/12	Cerro Verde		Be002	CV7	S0 53.700 W89 26.267	837 ft
29/10/12	Cerro Verde		Be003	CV8	S0 53.694 W89 26.289	871 ft
29/10/12	Cerro Verde		Be004	CV9	S0 53.642 W89 26.344	878 ft
29/10/12	Cerro Verde		Be005	CV10	S0 53.650 W89 26.380	899 ft
29/10/12	Cerro Verde	Maximo Becerra	Mb001	CV11	S0 53.637 W89 26.163	804 ft

29/10/12	Cerro Verde		Mb002	CV12	S0 53.606 W89 26.147	706 ft
29/10/12	Cerro Verde		Mb003	CV13	S0 53.568 W89 26.119	705 ft
29/10/12	Cerro Verde		mb004	CV14	S0 53.528 W89 26.066	680 ft
29/10/12	Cerro Verde		Mb005	CV15	S0 53.675 W89 26.232	809 ft
29/10/12	Cerro Verde		Mb006	CV16	S0 53.657 W89 26.231	822 ft
28/10/12	El Progreso	Braulio Pallo	Bp001	EP1	S0 54.012 W89 33.273	988 ft
28/10/12	El Progreso		Bp002	EP2	S0 54.031 W89 33.234	1044 ft
28/10/12	El Progreso		Bp003	EEP3	S0 54.051 W89 33.195	1018 ft
28/10/12	El Progreso		Bp004	EP3	S0 54.039 W89 33.153	1048 ft
28/10/12	El Progreso		Bp005	EP4	S0 54.006 W89 33.192	1063 ft
28/10/12	El Progreso	Gato Ortiz	Go001	EEP4	S0 54.335 W89 33.323	1041 ft
28/10/12	El Progreso		Go002	EP5	S0 54.342 W89 33.379	1025 ft
28/10/12	El Progreso		Go003	EP6	S0 54.318 W89 33.417	980 ft
28/10/12	El Progreso		Go004	EEP5	S0 54.282 W89 33.402	995 ft
28/10/12	El Progreso		Go005	EP7	S0 54.247 W89 33.435	995 ft
31/10/12	El Progreso	Miguel Guerrero	Mg001	EP8	S0 54.285 W89	104 ft

					33.141	
31/10/12	El Progreso		Mg002	EEP6	S0 54.353 W89 33.296	1045 ft
31/10/12	El Progreso		Mg003	EP9	S0 54.343 W89 33.260	1044 ft
31/10/12	El Progreso		Mg004	EP10	S0 54.310 W89 33.233	1072 ft
31/10/12	El Progreso		Mg005	EEP7	S0 54.306 W89 33.270	1028 ft
31/10/12	La Soledad	Cristobal Pallo	Cp001	LS1	S0 53.521 W89 32.703	1144 ft
31/10/12	La Soledad		Cp002	LS2	S0 53.529 W89 32.740	1078 ft
31/10/12	La Soledad		Cp003	LS3	S0 53.510 W89 32.774	1040 ft
31/10/12	La Soledad		Cp004	LS4	S0 53.536 W89 32.766	1110 ft
31/10/12	La Soledad		Cp005	LS5	S0 53.562 W89 32.752	1122 ft
31/10/12	La Soledad	Fernando Criollo	Fc001	LS6	S0 53.857 W89 32.834	1159 ft
31/10/12	La Soledad		Fc002	LS7	S0 53.932 W89 32.815	1140 ft
31/10/12	La Soledad		Fc003	LS8	S0 53.982 W89 32.827	1107 ft
31/10/12	La Soledad		Fc004	LS9	S0 53.985 W89 32.911	1153 ft
31/10/12	La Soledad		Fc005	LS10	S0 53.865 W89 32.853	1146 ft
31/10/12	La Soledad	Hacienda la Tranquila	Ht001	LS11	S0 53.287 W89 32.364	1237 ft

31/10/12	La Soledad		Ht002	LS12	S0 53.348 W89 32.332	1279 ft
31/10/12	La Soledad		Ht003	LS13	S0 53.347 W89 32.283	1316 ft
31/10/12	La Soledad		Ht004	LS14	S0 53.398 W89 32.291	1329 ft
31/10/12	La Soledad		Ht005	LS15	S0 53.388 W89 32.314	1294 ft
28/10/12	El Socavon	Centro Agricola	Ca001	SV1	S0 55.266 W89 33.232	796 ft
28/10/12	El Socavon		Ca002	SV2	S0 55.252 W89 33.229	808 ft
28/10/12	El Socavon		Ca003	SV3	S0 55.234 W89 33.204	810 ft
28/10/12	El Socavon		Ca004	SV4	S0 55.208 W89 33.210	806 ft
28/10/12	El Socavon		Ca005	SV5	S0 55.210 W89 33.249	808 ft
28/10/12	El Socavon	Esperanza Criollo	Ec001	SV6	S0 55.464 W89 33.022	716 ft
28/10/12	El Socavon		Ec002	SV7	S0 55.447 W89 33.001	702 ft
28/10/12	El Socavon		Ec003	SV8	S0 55.421 W89 33.002	708 ft
28/10/12	El Socavon		Ec004	SV9	S0 55.416 W89 32.983	732 ft
28/10/12	El Socavon		Ec005	SV10	S0 55.452 W89 32.976	754 ft
28/10/12	El Socavon	Hacienda Gonzales	Hg001	SV11	S0 55.801 W89 32.771	580 ft
28/10/12	El Socavon		Hg002	SV12	S0 55.772 W89	610 ft

					32.793	
28/10/12	El Socavon		Hg003	SV13	S0 55.783 W89 32.839	602 ft
28/10/12	El Socavon		Hg004	SV14	S0 55.799 W89 32.885	587 ft
28/10/12	El Socavon		Hg005	SV15	S0 55.747 W89 32.888	619 ft
30/10/12	El Junco	Guido Rocillo	Gr001	EJ1	S0 53.163 W89 28.774	2043 ft
30/10/12	El Junco		Gr002	EJ2	S0 53.186 W89 28.757	2054 ft
30/10/12	El Junco		Gr003	EJ3	S0 53.220 W89 28.764	2051 ft
30/10/12	El Junco		Gr004	EJ4	S0 53.219 W89 28.800	2028 ft
30/10/12	El Junco		Gr005	EJ5	S0 53.179 W89 28.795	2004 ft
29/10/12	El Junco	Juan Matapunelio	Jm001	EJ6	S0 53.421 W89 28.201	1871 ft
29/10/12	El Junco		Jm002	EJ7	S0 53.460 W89 28.179	1827 ft
29/10/12	El Junco		Jm003	EJ8	S0 53.497 W89 28.148	1773 ft
29/10/12	El Junco		Jm004	EJ9	S0 53.549 W89 28.118	1722 ft
29/10/12	El Junco		Jm005	EJ10	S0 53.466 W89 28.182	1844 ft
29/10/12	El Junco		Jm006	EJ11	S0 53.371 W89 28.232	1847 ft
30/10/12	El Junco	Tito C.	Tc001	EJ12	S0 53.378 W89 28.874	1985 ft

30/10/12	El Junco		Tc002	EJ13	S0 53.359 W89 28.899	1938 ft
30/10/12	El Junco		Tc003	EJ14	S0 53.323 W89 28.915	1953 ft
30/10/12	El Junco		Tc004	EJ15	S0 53.312 W89 28.883	2004 ft
30/10/12	El Junco		Tc005	EJ16	S0 53.324 W89 28.853	2009 ft
30/10/12	El Junco		Tc006	EJ17	S0 53.323 W89 28.859	2011 ft
30/10/12	El Junco		Tc007	EJ18	S0 53.351 W89 28.863	1998 ft
30/10/12	Cerro Gato	Jorge Chuquimarca	Jch001	CG1	S0 55.368 W89 29.297	854 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jch002	CG2	S0 55.432 W89 29.329	757 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jch003	CG3	S0 55.468 W89 29.342	725 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jch004	CG4	S0 55.482 W89 29.381	724 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jch005	CG5	S0 55.462 W89 29.411	708 ft
30/10/12	Cerro Gato	Jaime Ricaurte	Jr001	CG6	S0 55.394 W89 28.947	832 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jr002	CG7	S0 55.366 W89 28.902	824 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jr003	CG8	S0 55.323 W89 28.796	790 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jr004	CG9	S0 55.446 W89 29.131	855 ft
30/10/12	Cerro Gato		Jr005	CG10	S0 55.444 W89	867 ft

					29.119	
30/10/12	Cerro Gato	Milton Aguas	Ma001	CG11	S0 55.402 W89 29.207	831 ft
30/10/12	Cerro Gato		Ma002	CG12	S0 55.427 W89 29.225	761 ft
30/10/12	Cerro Gato		Ma003	CG13	S0 55.431 W89 29.244	785 ft
30/10/12	Cerro Gato		Ma004	CG14	S0 55.413 W89 29.227	768 ft
30/10/12	Cerro Gato		Ma005	CG15	S0 55.373 W89 29.218	795 ft