

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Determinación de la diversidad genética del guayabillo
(*Psidium galapegeium*) y comparación con la diversidad
genética encontrada en la guayaba (*Psidium guajava*) en la
Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.**

Proyecto de investigación

Sara María Ponce Gómez
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 20 de diciembre mes de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Determinación de la diversidad genética del guayabillo (*Psidium galapageium*) y comparación con la diversidad genética encontrada en la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador.

Sara María Ponce Gómez

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 20 de diciembre de 2016

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma del estudiante: _____

Nombres y apellidos: Sara María Ponce Gómez

Código: 00107588

Cédula de Identidad: 1716474372

Lugar y fecha: Quito, diciembre de 2016

RESUMEN

Las Islas Galápagos, en Ecuador, representan un ecosistema frágil en el que las especies introducidas pueden convertirse fácilmente en especies invasivas y amenazar a las especies endémicas. El guayabillo, *Psidium galapageium*, es un ejemplo de especie endémica de las Islas Galápagos que podría verse amenazada por la presencia de *Psidium guajava*, la guayaba, especie introducida que es de propagación rápida y de fácil dispersión. El análisis de diversidad genética de las dos especies es útil para entender su coexistencia en un ambiente insular. En este estudio se analizó la diversidad genética de *P. galapageium* en la Isla San Cristóbal utilizando marcadores microsatélites diseñados para guayaba y se comparó con los resultados obtenidos en un estudio previo realizado en guayaba utilizando los mismos marcadores. Los marcadores heterólogos presentaron un porcentaje de transferibilidad de 39.1%. En base a los resultados obtenidos, el guayabillo, presenta una diversidad genética moderada ($H_e = 0.467$). Comparando los índices de Nei obtenidos para las dos especies, se encontraron valores cercanos a cero lo que refleja poca diferenciación genética entre los grupos analizados. Los resultados del PCoA para las dos especies también indican ciertas agrupaciones específicas pero que no están relacionadas necesariamente con los sitios de recolección. Los valores F_{ST} encontrados reflejan un flujo génico elevado en las dos especies. Adicionalmente, los resultados obtenidos mediante el método bayesiano permitieron obtener un valor de k óptimo de 2 y un gráfico en el que no se observa una estructura poblacional definida. Finalmente, los análisis preliminares realizados para identificar eventos de hibridación entre las dos especies en los sitios de estudio, evidencian la ausencia de híbridos entre *P. galapageium* y *P. guajava* en la Isla San Cristóbal, Galápagos.

Palabras clave: microsatélites, diversidad genética, híbridos, especies endémicas, especies invasoras

ABSTRACT

The Galapagos Islands, in Ecuador, represent a fragile ecosystem where introduced species may easily become invasive and threaten the endemic species. "The Galapagos guava", or "guayabillo", *Psidium galapageium*, is an example of an endemic species of these islands. Guayabillo could be threaten by the presence of *Psidium guajava*, the guava, because this introduced species is capable of rapid spread and easy dispersion. In the present study, the genetic diversity of *Psidium galapageium* was analyzed, in San Cristóbal island using primers designed for guava (heterologous primers). These primers were used to analyze microsatellite regions of guayabillo's genome, in order to compare the genetic diversity between the two species. The heterologous primers showed a transferabilitypercentage of 39.1%. Based on the results obtained, guayabillo presents a moderate genetic diversity ($H_e=0.467$), and guayaba presents a low genetic diversity ($H_e=0.205$). Comparing the Nei indexes for both species, the values were closeto zero. This shows a low genetic differentiation between the analyzed groups. The results obtained in the PCoA for both species suggest certain specific groups but they are not necessarily related with the collection sites. The F_{ST} values reflect an elevated gene flow in both species. Additionally, results obtained with the Bayesian method used in STRUCTURE software with a k value of 2, demonstrate the absence of population structure, which corroborates the fact that there is high gene flow within the populations of guayabillo. Finally, the results obtained in this preliminary study demonstrate the absence of hybrids between *P. galapageium* and *P. guajava* in San Cristóbal, Galápagos.

Key words: microsatellites, genetic diversity, hybrids, invasive species, endemic species

TABLA DE CONTENIDO

Derechos de Autor.....	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
TABLA DE CONTENIDO.....	6
Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	9
Índice de anexos.....	10
1. Introducción	11
1.1 Islas Galápagos, Biodiversidad en las Islas, Especies endémicas	11
1.2 Especie en estudio.....	12
1.3 Problemática de especies invasoras en ecosistemas insulares.....	13
1.4 Diversidad Biológica y Genética	15
1.5 Marcadores Moleculares SSR	15
2. Objetivos.....	17
2.1 Objetivo General	17
2.2 Objetivos Específicos	17
3. Justificación.....	18
4. Área de Estudio.....	20
5. Materiales	21
5.1 Material Vegetal.....	21
5.2 Extracción de ADN	21
5.3 Cuantificación de ADN.....	21
5.4 Amplificación de regiones microsatélites	21
5.5 Electroforesis en geles de agarosa	22
5.6 Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	22
5.7 Tinción con nitrato de plata.....	22
5.8 Análisis de Resultados.....	23
6. Métodos	24
6.1 Recolección de Muestras	24
6.2 Extracción de ADN	24
6.3 Preparación de Muestras:	25
6.4 Amplificación con primers heterólogos:.....	25
6.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida:	26
6.6 Análisis de Datos:	27
7. Resultados.	29
7.1 Extracción y Cuantificación de ADN:.....	29
7.2 Amplificación de regiones microsatélites con primers heterólogos:.....	29
7.3 Análisis de datos:.....	30
8. Discusión.....	34
8.1 Flujo Génico	35
8.2 Diversidad Genética	37

8.3 Estructura Poblacional.....	39
8.4 Análisis de Híbridos	40
9. Conclusiones	45
10. Recomendaciones	46
11. Referencias bibliográficas.....	47
12. Tablas.....	51
13. Figuras.....	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Primers Microsatélites utilizados para la amplificación de muestras de guayabillo diseñados por Kanupriya et al. 2011	51
Tabla 2: Parámetros de diversidad genética obtenidos para individuos de guayabillo en 7 localidades de la isla San Cristóbal, Galápagos.	52
Tabla 3: Índices globales de diversidad genética obtenidos para las localidades muestreadas de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos.....	52
Tabla 4: Distancias genéticas de Nei obtenidas para individuos analizados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos	53
Tabla 5: Valores FST obtenidos para individuos de guayabillo analizados en la Isla San Cristóbal, Galápagos.....	53
Tabla 6: Tabla comparativa de valores obtenidos para guayaba y guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de las localidades muestreadas en el sur de la isla San Cristóbal, Galápagos	54
Figura 2: PCoA de individuos de guayabillo de la Isla San Cristóbal, Galápagos. Grupo 1: Cuadrantes 1 y 2 parte superior, individuos de la localidad Las Goteras (LGO), Galapaguera (GAL) y Cerro Gato (CGA11 y CGA5). Grupo 2: cuadrantes 2 y tres lado izquierdo, individuos de la localidad Cerro Gato, Cerro Verde (CV), Galapaguera, Perimetral (Per), Camino a Opuntias (CaO), Centro de Reciclaje (CR). Grupo 3: Cuadrantes 1 y 4 lado derecho, individuos de la localidad Las Goteras (LGO4), Galapaguera, Cerro Verde, Centro de Reciclaje, Perimetral.	55
Figura 3: Índice de Mantel para individuos analizados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos.	56
Figura 4: Porcentajes de la Varianza Molecular obtenida para los individuos de guayabillo analizados en la Isla San Cristóbal, Galápagos	56
Figura 5: Gráfico de estructura poblacional del guayabillo utilizando un k óptimo de 2	57
Figura 6: Gráfico obtenido para el análisis de híbridos entre individuos de guayaba y guayabillo utilizando $k=2$, se observa un grupo de individuos de guayabillo y otro grupo separado de individuos de guayaba, no se observa la presencia de híbridos.	57
Figura 7: Gráfico obtenido para el análisis de híbridos entre individuos de guayaba y guayabillo utilizando $k=3$, se observa un grupo de individuos de guayabillo (rojo) y un grupo de individuos de guayaba con dos posibles orígenes, no se observa presencia de híbridos	58

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Planta de guayabillo de la localidad Las Goteras (Julio, 2014)	59
Anexo 2: Tabla de individuos muestreados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos con coordenadas de las localidades muestreadas.	59
Anexo 3: Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción de PCR para amplificación de SSR de guayabillo.....	62
Anexo 4: Programa de ciclado para amplificación de SSR de guayabillo.....	62
Anexo 5: Tabla de concentraciones de ADN extraído de muestras de guayabillo de siete diferentes localidades en la Isla San Cristóbal, Galápagos	62
Anexo 6: Foto gel acrilamida utilizando primer CIR05 para amplificar muestras de ADN de guayabillo de la Isla San Cristóbal, Galápagos	65

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Islas Galápagos, Biodiversidad en las Islas, Especies endémicas

Las Islas Galápagos son un grupo de trece islas principales, algunos islotes y rocas que se encuentran debajo de la línea ecuatorial a 1000 km de la costa del Pacífico. El Archipiélago ocupa 7880 km² y está situado sobre la placa de Nazca (Brewington, L, 2011). La formación de estas islas se dio hace aproximadamente 4 millones de años debido a un proceso de erupciones volcánicas que permitieron que estas masas de tierra emergieran de la superficie del océano. En la actualidad, se considera uno de los grupos volcánicos más activos del mundo y por lo tanto, se concluye que siguen en constante formación (Brewington, L, 2011)..

Las islas conforman un archipiélago con gran diversidad biológica. La evolución de la flora y fauna de este archipiélago ha permitido contar con una variedad de especies que se encuentran únicamente en estas islas. Además, la distancia de las islas con el continente y el hecho de que estas nunca estuvieron unidas al mismo han permitido que las especies que se encuentran allí sean endémicas de este lugar y por lo tanto no se las pueda encontrar en ningún otro ecosistema (Brewington, L, 2011)..

Las Islas fueron descubiertas en el año de 1535 por Fray Tomás de Berlanga, por lo tanto, se considera que cualquier organismo vivo que llegó después de este momento, es introducido. Cuando en el año 1835, Charles Darwin estuvo en las Islas Galápagos, habitaban muchas especies, algunas de ellas eran endémicas y otras habían llegado a las Islas gracias a corrientes marinas (Brewington, L, 2011). En la actualidad, en las Islas Galápagos están presentes más de 800 especies vegetales introducidas, número superior a la suma de especies nativas y endémicas (552) (Tye, A, 2002, 2004, 2006); sin embargo, en los últimos años, se ha continuado estudiando el número total de especies tanto introducidas como endémicas (Jager, H, Número de Especies Introducidas en las Islas Galápagos, 2016). Dentro de estas

especies introducidas alrededor de 30 son consideradas “agresivas”, es decir, especies de fácil dispersión, alto índice de germinación y que ocupan superficies extensas desplazando a especies endémicas tanto vegetales como animales (Itow, S, 2003). La introducción de especies puede afectar a la estabilidad y permanencia de las poblaciones endémicas y adicionalmente puede influir en su diversidad genética (Funk, J y Throop, H, 2010).

La Isla San Cristóbal es la isla más oriental del Archipiélago de Galápagos, ésta tiene una superficie de 558 km² y su punto más alto se encuentra a 730 metros sobre el nivel del mar. Esta isla posee una gran cantidad de especies botánicas invasoras, las que más se han dispersado en esta isla son la guayaba (*Psidium guajava*), la mora (*Rubus ulmifolius*), la pomarrosa (*Syzygium jambos*) y la supirrosa (*Lantana camara*)(Chiriboga, R y otros, 2006). La guayaba, *Psidium guajava*, fue introducida desde el Ecuador continental, alrededor de 1850 para utilizarla como alimento para el ganado (Walsh, y otros, 2008). Las especies vegetales que son introducidas pueden representar un problema para aquellas especies que son endémicas porque causan alteraciones en los paisajes y son una de las causas principales de pérdida de la diversidad genética (Magee, L y otros, 2001; Brewington, L 2011).

1.2 Especie en estudio

El guayabillo, *Psidium galapegium*, es una especie endémica de Galápagos (Anexo 1). Es un arbusto que puede alcanzar máximo ocho metros de altura, tiene hojas elípticas, flores axilares y su fruto es pequeño y tiene forma de baya. Se ha reportado su presencia en algunas islas del Archipiélago de Galápagos pero su distribución exacta es desconocida (Jaramillo Díaz, P & Guézou, A, 2013). El guayabillo, *P.galapageium*, tiene dos variedades: *P. galapageium* var. *galapageium* y *P. galapageium* var. *howellii*. Esta última es considerada "rara" y se la ha encontrado en las Islas San Cristóbal y Santa Cruz. Se distingue porque posee flores de 1cm de ancho y sus pétalos tienen entre 4 y 5.5 cm de longitud. La otra variedad, *P.*

galapageium var. *galapageium*, ha sido reportada en las Islas Fernandina, Isabela, Pinta, Santa Cruz y Santiago. Se caracteriza porque a diferencia de la variedad *howellii*, tiene flores más grandes de 1.5 cm de ancho y sus pétalos son de 8 y 9 mm de longitud (McMullen, CK, 1999; Porter, D, 1969).

1.3 Problemática de especies invasoras en ecosistemas insulares

Los ecosistemas de islas son muy interesantes debido a que son sistemas en donde hay evolución en aislamiento con distribuciones geográficas pequeñas y con proximidad a hábitats diversos. Estas características de los sistemas insulares han estado involucradas en la ocurrencia de novedades evolutivas y procesos de especiación (Randell, R y otros, 2004). Sin embargo, estas mismas características hacen que las especies insulares sean extremadamente susceptibles a la extinción. El hecho de que las especies insulares evolucionen aisladas geográficamente y en ausencia de mamíferos grandes las ha dejado pobremente preparadas para enfrentar los disturbios frecuentes en el hábitat causados por los seres humanos (Randell, R y otros, 2004).

El ecosistema de las Islas Galápagos siempre ha estado amenazado debido a la presencia de varias especies invasoras tanto animales como vegetales (Schofield, EK, 1989). Las especies invasoras son de gran interés debido a su rápida propagación y a los efectos de desplazamiento que pueden tener en relación con las especies endémicas y nativas. En el censo realizado en el año 2013, se reportó un total de 1581 especies diferentes de plantas vasculares en las islas Galápagos (Jaramillo Díaz, P y Guézou, A, 2013). Adicionalmente, se informó que existen 560 especies nativas, donde 180 son consideradas endémicas (Tye, A, 2002, 2004, 2006), sin embargo, existen estudios más recientes que buscan encontrar el número más actualizado de especies tanto invasoras como endémicas (Jager, H, , 2016). El caso de la guayaba es interesante debido a su dispersión rápida y a su relación tan cercana con

la especie endémica de Galápagos, *Psidium galapageium*. Poco tiempo después de la introducción de esta especie a las islas, se reportó que había escapado los campos de cultivo y que se convirtió en una especie silvestre (Mauchamp, A, 1997). . Se la considera invasora de las islas porque sus semillas pueden dispersarse a lo largo de extensas distancias gracias a los pájaros, pequeños mamíferos, vacas, entre otros dispersores. Su introducción ha presentado un efecto negativo en el ecosistema debido a que es una planta leñosa y éstas afectan a las plantas locales causando alteraciones de los paisajes, tapando la luz a otras plantas, modificando la composición del suelo y desplazando a especies locales (Jager, H y otros, 2007).

La guayaba se ha convertido en una especie invasora de gran preocupación para la conservación en las islas debido a sus patrones de amplia distribución y a la alteración visible que ha causado en el hábitat (Jager, H y otros, 2007).. Las especies introducidas a ecosistemas insulares se encuentran separadas de su población original y por lo tanto no pueden tener flujo génico con ésta. En la colonización, los individuos de una población van a un nuevo ecosistema y se encuentran bajo presión selectiva en donde únicamente los que se adaptan a los cambios, sobreviven. Esta especie que invadió un ecosistema pasa por un cuello de botella en donde pierde diversidad genética, y los individuos que sobreviven compiten con especies del nuevo ambiente para lograr establecer su nicho. De esta manera, las especies invasoras logran desplazar y afectar a las especies locales y son una de las causas principales de la pérdida de diversidad (Lee, CE, 2002).

En la Isla San Cristóbal se ha visto la presencia del guayabillo endémico *Psidium galapageium* y la guayaba introducida *Psidium guajava* (Porter, D, 1969; Wiggins, I y Porter, D, 1971).Esta coexistencia entre la especie endémica y la introducida genera retos para el control de la especie introducida y para la conservación de la especie endémica. Es importante determinar la diversidad genética de las dos especies ya que de esta manera se puede conocer

el éxito relativo de cada una de ellas como resultado de sus interacciones con el entorno. Con este conocimiento, sería más fácil establecer programas de manejo de las dos especies en las islas.

1.4 Diversidad Biológica y Genética

La diversidad biológica es la variabilidad de organismos vivos que habitan en un determinado ecosistema. Dentro de esta diversidad biológica, se encuentra incluida la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y la diversidad que existe en los ecosistemas. La diversidad de especies es la frecuencia y variedad de diferentes especies. Por otro lado, la diversidad genética se refiere a la frecuencia y diversidad de los diferentes genes o genomas dentro de una misma especie. Es decir, incluye las variaciones entre de una población y también entre poblaciones (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1996). Se puede concluir que la diversidad genética se define como la cantidad de variabilidad que hay dentro de una población y que se manifiesta en diferencias en la secuencia de ADN, características bioquímicas, propiedades fisiológicas o incluso en características morfológicas. La variación que existe entre individuos es causada por mutaciones y recombinaciones. La deriva génica, selección natural y artificial y el flujo de genes provocan variaciones y diversidad entre especies (Eguiarte, L y otros, 2010).

1.5 Marcadores Moleculares SSR

Una de las formas de analizar la diversidad genética es mediante marcadores moleculares. Los marcadores moleculares son secuencias de ADN cuya presencia permite indicar la presencia de otro locus de interés, es decir tienen un efecto cuantificable u observable que se detecta fácilmente (Picó, M & Pérez de Castro, A, 2012). Adicionalmente, una de las funciones más importantes de los marcadores moleculares para estudiar diversidad genética, es el hecho de que permiten determinar los genotipos de los individuos que se

analiza, en los loci analizados, y gracias a esto es posible calcular las frecuencias alélicas y genotípicas de las poblaciones estudiadas. Uno de los marcadores moleculares más comúnmente utilizados son los microsatélites. Estas son secuencias constituidas por pocos pares de bases (de uno a seis aproximadamente) que se repiten en tándem a lo largo del genoma. Estas secuencias son abundantes en genomas de organismos eucariotas. Cada secuencia microsatélite, se define por el número de repeticiones y por el locus que ocupan en el genoma. Existen diferencias en la longitud entre los distintos alelos en el mismo locus debido a que hay un número diferente de repeticiones en la secuencia. Los microsatélites tienen una alta tasa de mutación. Se conoce que los polimorfismos son causados por la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante el proceso de replicación del ADN (Picó, M & Pérez de Castro, A, 2012).

Se utiliza a los microsatélites como marcadores moleculares debido a que sus regiones flanqueantes son conservadas, por lo tanto, es posible usarlas para poder amplificar de forma específica los alelos de cada locus. A partir de la reacción en cadena de la polimerasa, PCR, se puede analizar a los microsatélites y usarlos en genética forense, estudios de paternidad, análisis poblacionales, estudios de diversidad, construcción de mapas genéticos, entre otras aplicaciones (Picó, M y Pérez de Castro, A, 2012).

En el presente estudio, se utilizó 23 combinaciones de primers heterólogos diseñados para la amplificación de regiones microsatélites de ADN de guayaba (*Psidium guajava*) con el objetivo de evaluar la diversidad genética de 77 individuos de la especie endémica (*Psidium galapageium*) de 7 localidades de la Isla San Cristóbal y compararla con la de la especie introducida.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la diversidad genética de la especie *Psidium galapageium* en la Isla San Cristóbal mediante la utilización de marcadores moleculares microsatélites.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar la posibilidad de transferir primers SSR de *P. guajava* a *P. galapageium*.
- b) Evaluar la diversidad genética de *P. galapageium* en la Isla San Cristóbal usando primers SSR de *P. guajava*.
- c) Comparar la diversidad genética de las dos especies: *P. galapageium* y *P. guajava*.
- d) Analizar la existencia de eventos de hibridación entre las dos especies: *P. galapageium* y *P. guajava* mediante la utilización de estadística bayesiana.

3. JUSTIFICACIÓN

A partir de los resultados obtenidos en un estudio previo acerca de la diversidad genética de la guayaba, *Psidium guajava*, en la Isla San Cristóbal, se propone determinar la diversidad genética de otra especie del género *Psidium*, el guayabillo (*Psidium galapageium*), endémica de Galápagos. La especie introducida *Psidium guajava*, es una especie agresiva y por lo tanto de alta dispersión. La guayaba fue introducida al Archipiélago alrededor de 1850 como fruta y alimento para el ganado (Walsh, SJ y otros, 2008).y en la actualidad se encuentra ampliamente distribuida en los ecosistemas agrícolas y silvestres de las Islas Galápagos (Jaramillo Díaz, P & Guézou, A, 2013).. Se conoce que esta especie ocupa aproximadamente 40.000 ha de las islas, y está distribuida principalmente en la parte alta de San Cristóbal,y en la Isla Isabela (Herrera, X, 2013).

La especie endémica, *P. galapageium* tiene dos variedades: *Psidium galapageium* var. *howellii* y *Psidium galapageium* var. *galapageium*. De acuerdo al informe de la Fundación Charles Darwin, ambas variedades están catalogadas como amenazadas, es decir, con un riesgo alto de extinción. Adicionalmente, de ninguna de estas variedades se conoce su distribución espacial exacta en el Archipiélago (Jaramillo Díaz, P & Guézou, A, 2013).. La presencia de una especie introducida con amplia distribución y su congénere endémica establece retos tanto para el control y erradicación de las primeras como para la conservación de las últimas. El hecho de que coexistan en un mismo hábitat puede ocasionar la hibridación natural. Este fenómeno ya ha ocurrido en Hawaii con el género *Rubus* y las consecuencias fueron negativas para la especie endémica, principalmente debido a la pérdida de fitness de la especie endémica ya que los híbridos tuvieron una mejor adaptación (Randell, R y otros, 2004). Adicionalmente, en la Isla Socorro en México también se encontró la existencia de individuos híbridos entre la especie endémica insular *Psidium socorrense* y la especie

Psidium sartorianum (López-Caamal, A y otros, 2014). Ejemplos como éstos, resaltan la importancia de documentar las relaciones moleculares y genéticas entre especies endémicas y exóticas de un mismo género. Por lo tanto, la realización de estudios de diversidad genética se vuelve esencial y de gran utilidad como fuentes de información para programas de conservación de especies endémicas y para el establecimiento de programas de control de plagas. También, este tipo de investigaciones contribuyen a complementar la información obtenida de otros análisis. Por ejemplo, la distribución espacial y los patrones de variación morfológica de una determinada especie (Itow, S, 2003). Por último, estudios de esta naturaleza ayudan a proponer patrones evolutivos, comportamientos reproductivos y modelos de dispersión que podría tener una especie (Itow, S, 2003). Esta segunda fase del proyecto pretende evaluar la diversidad existente dentro de la especie *Psidium galapageium* y establecer una comparación con la diversidad de *P. guajava* y analizar procesos de hibridación entre la especie endémica y la introducida. Este análisis genético-molecular busca obtener información inicial que, junto con estudio botánicos y ecológicos de ambas especies, puede servir como sustento y apoyo en la ejecución de programas de conservación de *P. galapageium* y de manejo y control de *P. guajava*.

4. ÁREA DE ESTUDIO

La recolección del material vegetal se realizó en 7 localidades agrícolas de la isla San Cristóbal, Ecuador (Las Goteras, Perimetral, Cerro Verde, Cerro Gato, Galapaguera, Camino a Opuntias y Centro de Reciclaje). En cada localidad se recolectó muestras de hojas de individuos de guayabillo con un mínimo de cinco individuos y un máximo de 17 individuos por localidad (Anexo 2). Adicionalmente, se recolectó muestras de hojas de un individuo de guayaba por localidad para utilizarlo como control positivo en la amplificación con primers heterólogos.

La extracción, cuantificación y dilución del ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Galápagos Science Center (GSC) en la isla San Cristóbal. La amplificación del ADN, la electroforesis en geles de poliacrilamida y el análisis estadístico de las muestras de guayabillo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

5. MATERIALES

5.1 Material Vegetal

- Hojas de 77 individuos de guayabillo de 7 localidades diferentes en la isla San Cristóbal.
- 1. Centro de Reciclaje (10 muestras de guayabillo, 1 muestra de guayaba)
- 2. Camino a Opuntias (11 muestras de guayabillo, 1 muestra de guayaba)
- 3. Perimetral (5 muestras de guayabillo, 1 muestra de guayaba)
- 4. Galapaguera (17 muestras de guayabillo, 1 muestras de guayaba)
- 5. Las Goteras (16 muestras de guayabillo, 1 muestras de guayaba)
- 6. Cerro Verde (5 muestras de guayabillo, 1 muestras de guayaba)
- 7. Cerro Gato (13 muestras de guayabillo, 1 muestras de guayaba)

5.2 Extracción de ADN

- Muestras de hojas de guayabillo y 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
- Etanol 70%

5.3 Cuantificación de ADN

- ADN de guayabillo y 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 guayabillo y guayaba
- 23 pares de primers heterólogos (Kanupriya, P y otros, 2011)
- Taq platinum ADN polimerasa 5U/ μ L (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)
- BSA

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 – Ácido 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 (Glicerol , 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® 10% v-v, Ácido Acético Glacial Merck® 0.5% v-v)

- Solución Tinción (Nitrato de Plata Fisher ScientificR 2g/L, Formaldehído
- J.T. BakerR 37% 0.00015% v-v)
- Solución Revelado (Hidróxido de Sodio MerckR 15g/L, Formaldehído J.T.
- BakerR 37% 0.0002% v-v)

5.8 Análisis de Resultados

- Software STRUCTURE
- GenALEx 6.0 (Peakall, R, 2012)
- DARWin 5.0.

6. MÉTODOS

6.1 Recolección de Muestras

La recolección de muestras del material vegetal se realizó durante dos salidas de campo que se llevaron a cabo, la una en los primeros meses de ejecución del proyecto, julio de 2014; y la segunda en febrero de 2015. Se recolectaron entre 2 – 5 hojas de 77 plantas de guayabillo distribuidas en diferentes sectores la Isla San Cristóbal. Las localidades de donde se obtuvieron las muestras fueron: Centro de Reciclaje, Cerro Verde, Cerro Gato, Las Goteras, Perimetral, Camino a Opuntias, Galapaguera (Figura 1). El material vegetal se guardó en fundas plásticas y se mantuvo en refrigeración.

6.2 Extracción de ADN

Se extrajo ADN utilizando buffer CTAB de acuerdo al protocolo descrito por Shagai y Maroof (Shagai-Maroof, M y otros, 1984). Se inició el proceso pesando 25 mg de material vegetal, después se maceró con nitrógeno líquido, colocando en un mortero previamente desinfectado con etanol al 70%. hasta que se formó un polvo muy fino, se colocó 800 ul de detergente catiónico CTAB ya que es un componente del buffer de extracción que forma complejos con las proteínas y no precipita los ácidos nucleicos (González, D y otros, 1995). De esta forma se liberó el ADN. Se procedió a colocar β -mercaptoetanol debido a que este actúa como agente reductor rompiendo los puentes disulfuro presentes entre las proteínas (Karcher, S, 1995). Se dejó incubar a 62°C por una hora agitando los tubos cada 10 minutos. Después, se colocó 500 ul de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 para separar las proteínas de los ácidos nucleicos (se formaron dos fases, en la fase acuosa se encontraron los ácidos

nucleicos). Se dejó reposar por veinte minutos y después se centrifugó por veinte minutos a 13800 rpm. Se separó la fase acuosa y se la pasó a otro tubo, se colocó alcohol isopropílico con el objetivo de precipitar el ADN, y se agitó los tubos delicadamente. Se centrifugó de dos a cinco minutos a 5000 rpm y se formó el pellet. Después se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con etanol 70% buscando que el pellet se desprenda del tubo. Se descartó completamente el etanol y se dejó secar el tubo, finalmente se resuspendió en 70 µl de TE.

6.3 Preparación de Muestras:

El ADN extraído se cuantificó mediante espectrofotometría y se diluyó a una concentración de 20 ng/µl.

6.4 Amplificación con primers heterólogos:

Con unas pocas muestras de ADN (10) se realizaron las pruebas de amplificación mediante PCR, usando 23 pares de primers SSR (microsatélites) (Kanupriya, P y otros, 2011) provenientes de *Psidium guajava*. Con los primers que se obtuvo amplificación exitosa (transferibilidad) se analizó todas las muestras de guayabillo recolectadas (Anexo 3).

Las reacciones de PCR y condiciones de ciclado utilizadas fueron las descritas en el estudio de Kanupriya y otros (2011). Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 µl 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, BSA 1 mg/L y 0.5 U de Taq Platinum. 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 a 61 °C dependiendo del primer (Anexo 4) 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.

6.5 Electroforesis en Gel de Poliacrilamida:

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 6% y teñidos con nitrato de plata (Benbouza, H y otros, 2006). Se considera que la electroforesis en geles de poliacrilamida es la técnica más versátil y eficaz para realizar análisis y separación de macromoléculas (Freider, D, 1981). Se utilizó el sistema SequiGen GT de Biorad. El primer paso fue realizar el lavado y tratamiento del vidrio de la cámara. Se lavó el vidrio con Alconox y se lo limpió con alcohol al 70%. Posteriormente, se trató al vidrio con Bind-Silane, que se encarga de la unión del gel de poliacrilamida al vidrio. A la cámara también se la lavó con Alconox, luego alcohol al 70% y después se la trató con RainX y Sigmacote. Para armar la cámara de electroforesis se inició con una limpieza de todos sus componentes con alcohol al 70%. Después se procedió a armar la cámara y se añadió 100mL de solución de poliacrilamida que contiene: urea 5M, acrilamida: bisacrilamida 19:1, Temed y persulfato de amonio 0.1%. Se colocó el peine para formar el frente de corrida y se esperó aproximadamente 1 hora a que se polimerice. Cuando ya se polimerizó, se añadió 450mL de TBE 1X en la base de la cámara y 1250 mL dentro de la cámara. Se procedió a sacar el peine y utilizando una pipeta Pasteur se retiró la urea sobrante, después se insertó el peine con los dientes hacia adentro para que se formen los pocillos y utilizando otra vez la pipeta Pasteur se retiró la urea. Se cargó 3 ul de buffer de carga saltando un pocillo y se realizó una precorrida para comprobar la calidad de los pocillos (45 minutos a 80 watts). Después de la precorrida se cargó 5 ul del producto del PCR previamente desnaturizado y se corrió el gel por tres horas a 80 watts a una temperatura máxima de 50°C. Para revelar los geles se realizó una tinción con nitrato de plata. El paso inicial consistió en 5 minutos en una solución fijadora que permanece refrigerada (200 mL de alcohol absoluto, 10 mL de ácido acético glacial y 17090 mL de agua destilada). Se colocó el vidrio con el gel hacia arriba en agua destilada por 8 segundos y se pasó el vidrio con el gel a

otra solución que es la de revelado. Esta consiste en 30 g de hidróxido de sodio 4 mL de formaldehído al 37% y 2 L de agua destilada. El vidrio permaneció en esta solución por 7 minutos con agitación constante y después se lo colocó nuevamente en la solución fijadora por 3 minutos. Se realizó un segundo lavado con agua destilada y se dejó secar el vidrio en posición vertical durante una noche para poder analizar los datos.

6.6 Análisis de Datos:

Se eliminó los individuos de los cuales no se pudo obtener información, y únicamente se analizó a aquellos de los que se tenía información completa (69 de 77). Se determinó el tamaño de los alelos por cada locus, en pares de bases, mediante una regresión lineal utilizando las medidas tomadas, tanto de los alelos encontrados, como del ladder, en los geles de poliacrilamida. Mediante el uso del software GenALEx 6.0 (Peakall, R, 2012) se calculó: frecuencias alélicas, número de alelos, heterocigocidad esperada e Índice de Shannon. Se realizó el análisis de estructura poblacional y de hibridación mediante la utilización del software STRUCTURE (Pritchard, J, 1998). Este software se fundamenta en el método bayesiano que está basado en la interpretación subjetiva de la probabilidad que se explica en el Teorema de Bayes. La metodología bayesiana explica un modelo de probabilidad en el que existe algún tipo conocimiento previo acerca de un parámetro investigativo, de este modo se condiciona al modelo de probabilidad para que este realice un ajuste de los supuestos acontecimientos (Mesa, L y otros, 2011). Para el análisis de estructura poblacional se asumieron siete poblaciones según el número de localidades de recolección de muestras. Se corrió el programa con un Burn-in de 30000 y un MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 100000 y se realizaron 5 iteraciones. Para el análisis de procesos de hibridación, se asumieron dos poblaciones, una de guayabillo y otra de guayaba y se realizaron dos corridas simples, una con $k=2$ y otra con $k=3$. El análisis de coordenadas principales (PCoA) se efectuó en el

software DARWin 5.0 (Perrier, X y otros, 2006). Se realizó un análisis comparativo de los resultados obtenidos para la especie endémica y para la especie introducida.

7. RESULTADOS.

7.1 Extracción y Cuantificación de ADN:

Se logró la estandarización del proceso para la extracción de ADN de guayabillo. Se extrajo ADN de 77 muestras de guayabillo colectadas en San Cristóbal (7 localidades) (Anexo 2). Las concentraciones de ADN obtenidas fueron muy variables entre muestras, desde 7.5 ng/ul hasta 442 ng/ul (Anexo 5).

7.2 Amplificación de regiones microsatélites con primers heterólogos:

Se probó los 23 pares de primers heterólogos para el guayabillo, reportados en el estudio de Kanupriya y otros (2011). De estos 23 primers, únicamente 9 amplificaron en las muestras de guayabillo analizadas, por lo tanto, la transferibilidad fue de 39.1%. Se extrajo ADN de 77 muestras de guayabillo, sin embargo, solo se trabajó con 69, las 8 muestras restantes se descartaron debido a que no se obtuvo amplificación. Se encontró un total de 25 alelos en las muestras analizadas, a diferencia de los 44 alelos encontrados en las 112 muestras de guayaba caracterizadas en el estudio previo en la Isla San Cristóbal (Ponce, MJ, 2014). Los loci analizados para el guayabillo demostraron ser polimórficos (3 o 4 alelos por locus) a excepción de dos (mPgCIR10 y mPgCIR22 que fueron monomórficos y que no se incluyeron para los análisis posteriores) (Tabla 1). El número de alelos encontrados en cada locus se presenta en la Tabla 1. Adicionalmente, en la Tabla 2, se muestra el promedio de

alelos diferentes encontrados en cada población. Se determinó que existen tres alelos exclusivos (cada uno en diferentes localidades y con diferentes marcadores)

7.3 Análisis de datos:

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), obtenido mediante el programa Darwin 5.0, se observa que todos individuos se distribuyen por los cuatro ejes sin agruparse de manera particular. Sin embargo, se puede sugerir tres agrupaciones principales formadas por individuos de diferentes localidades. En la Figura 2, en el primer grupo, ubicado en la parte superior, en los cuadrantes 1 y 2 y marcado de color azul, se encuentran individuos de las localidades Galapaguera (Gal) y Las Goteras (LGO). En el segundo grupo, ubicado entre los cuadrantes 2 y 3 y marcado de color verde, se encuentran individuos de las localidades Cerro Gato (CGa) y Cerro Verde (CV). Por último, en el tercer grupo ubicado entre los cuadrantes 4 y 1 y marcado de color rojo, se encuentran individuos de las localidades Cerro Verde, Galapaguera, Cerro Gato, Camino a Opuntias (CAO), Centro de Reciclaje (CR), Perimetral (Per) y Las Goteras.

Se utilizaron algunos parámetros para evaluar la diversidad genética de los individuos de guayabillo estudiados. Se evaluó el índice de Shannon que 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, S & Zeven, AC, 1990). Este índice refleja la heterogeneidad de una comunidad tomando en cuenta dos factores: el número de especies presentes en ese determinado lugar y su abundancia relativa (Pla,L, 2006). En este estudio se obtuvo un valor de 0.761 para el guayabillo; adicionalmente, la localidad con índice de Shannon más alto fue Camino a Opuntias con un valor de 0.717. Para la guayaba, el índice de Shannon fue de 0.285 y la localidad donde se encontró el mayor valor de índice de Shannon fue Socavón con un valor de 0.357 (Ponce, MJ, 2014). Se obtuvo el valor de He

(Heterocigosidad esperada) (Tabla 3) de 0.467, obtenido calculando el valor promedio entre la He de cada marcador. Este valor permite concluir que la diversidad genética del guayabillo es moderada, como se reportó en un estudio similar en el que la He fue de 0.49 y se determinó que la diversidad genética del mortiño era moderada (Cobo, M y otros, 2015).

La distancia genética de Nei permite establecer el grado de divergencia (o similitud) que hay entre grupos o localidades. Mientras mayor sea esta distancia, los individuos se encuentran más distantes entre sí (Hennink, S & Zeven, AC, 1990) Los valores de distancia genética de Nei obtenidos para el guayabillo son valores cercanos a cero (Tabla 4). El más alto se encuentra entre las localidades Centro de Reciclaje y Cerro Verde (0.535), y el más bajo se encuentra entre Camino a Opuntias y Centro de Reciclaje (0.037). Estos valores indican que existe una mayor distancia genética entre los individuos de las localidades de Centro de Reciclaje y Cerro Verde, sin embargo, siguen siendo valores bajos, por lo tanto hay poca divergencia entre los grupos evaluados. Las distancias encontradas para la guayaba son valores muy cercanos a cero, lo cual indicaría poca divergencia genética entre los individuos. Para la guayaba en San Cristóbal, se encontró que la mayor divergencia existe entre Cerro Gato y Cerro Verde con un valor de 0.06 y la menor entre El Junco y La Soledad con un valor de 0.002 (Ponce, MJ, 2014).

Se realizó la prueba de Mantel para ver si existe una relación entre la distancia genética con la distancia geográfica y se determinó que no existe una relación ($R^2=0.001$) (Figura 3). Adicionalmente, se determinó el índice FST de Wright que describe valores de fijación de alelos dentro de una población. Los valores de cero indican que hay flujo génico entre poblaciones y por lo tanto no hay alelos fijados, mientras que los valores de 1 indican fijación de alelos y por lo tanto que no existe flujo génico (Eguiarte, L y otros, 2010). Los valores FST encontrados para el guayabillo son cercanos a cero, por lo tanto, se puede sugerir que para la muestra analizada existe un elevado flujo génico entre los individuos de las

diferentes localidades (Tabla 5) y que se trata de una población panmítica en la que los individuos se cruzan libremente. El menor valor se encontró entre las localidades de Camino a Opuntias y Perimetral (0.018) y el mayor entre Cerro Verde y Centro de Reciclaje (0.222). Para la guayaba, se encontró mayor flujo génico entre las localidades de El Junco y La Soledad (0.023) y menor entre Cerro Gato y Cerro Verde (0.1). Los valores obtenidos para la guayaba indican que existe un alto flujo génico entre los individuos de las localidades muestreadas. Adicionalmente, los valores obtenidos para los porcentajes de diferenciación (AMOVA), presentados en la Figura 4, entre de las poblaciones y entre los individuos corroboran el hecho de que se trata de una población panmítica donde los individuos se están cruzando libremente. Cuando se trata de poblaciones panmíticas, se espera tener el mayor porcentaje de varianza dentro de los individuos (within individuals); cuando se obtiene que la mayor varianza ocurre entre los individuos dentro de las poblaciones o entre las poblaciones, entonces existe una evidencia de que hay algún tipo de estructura poblacional. En el caso del guayabillo, el mayor porcentaje de diferenciación se obtuvo dentro de los individuos (within individuals) (81%) corroborando la falta de estructura poblacional en el guayabillo (Grünwald, NJ y otros, 2008). (Grünwald, Kamvar, & Everhart, 2008)

Finalmente, se realizó un análisis de estructura poblacional y de eventos de hibridación mediante la utilización del software STRUCTURE. Para el análisis de estructura poblacional del guayabillo, se obtuvo un valor k óptimo de 2. Esto indica que existen 2 posibles linajes para el guayabillo, sin embargo, observando el gráfico (Figura 5), se puede determinar que estos linajes aportaron indiscriminadamente y que no existe una estructura poblacional determinada. Para el análisis de híbridos, se obtuvo dos gráficos diferentes. En uno se evaluó al guayabillo y a la guayaba como dos poblaciones independientes en donde se esperaba que, si existirían híbridos, se observe a los individuos híbridos en el gráfico como

una mezcla entre el guayabillo y la guayaba. En el gráfico obtenido(Figura 6) se observa que estas dos poblaciones están separadas y que son diferentes. Al no existir penetrancia de un grupo poblacional sobre el otro, se puede asumir que existen dos grupos diferenciados y que no hay interacción entre ellos (no hay híbridos). El siguiente análisis fue tomando una k de 3(Figura 7), y se esperaba observar la formación de un grupo para el guayabillo, otro para la guayaba y un tercero para los posibles híbridos. Sin embargo, se obtuvieron dos grupos, uno para el guayabillo, y otro la guayaba., En el grupo de la guayaba se observan dos posibles linajes, sin embargo, en el gráfico se corrobora la ausencia de híbridos.

8. DISCUSIÓN

Las Islas Galápagos representan un ecosistema único considerado un laboratorio de evolución. Es fundamental realizar estudios de diversidad genética con el objetivo de entender el estado en el que se encuentran tanto las especies endémicas como las especies introducidas y planificar estrategias de conservación (Jaramillo Díaz, P & Guézou, A, 2013). Este es un estudio preliminar de la diversidad genética del guayabillo, una especie endémica de las islas, y la comparación de esta diversidad con la de la guayaba, una especie invasora del mismo género, en la Isla San Cristóbal en Galápagos.

Se probó un total de 23 pares de primers SSR diseñados por Kanupriya y otros,(2011) para cultivares de guayaba en India. El porcentaje de transferibilidad de primers (Tabla 6) demuestra que los primers SSR utilizados en este estudio permiten la amplificación cruzada entre especies pertenecientes al mismo género. El estudio realizado por Valdez-Infante y otros (2010), busca la transferibilidad de primers SSR diseñados para guayaba en diferentes especies dentro de la familia Myrtaceae y en sus resultados se ha visto que es posible analizar varias especies del género *Psidium*, *Eugenia* y *Zyzygium*. Se encontró que los marcadores SSR mPg137 y mPg 176, diseñados para guayaba, tienen capacidad discriminatoria y sirven para la identificación y análisis de diversidad en varios representantes de la familia Myrtaceae gracias a su alto nivel de polimorfismo.

Los índices de diversidad obtenidos para el guayabillo indican que es una especie que tiene una diversidad genética moderada (H_e : 0.467, Tabla 3) . El número total de alelos encontrados (25, Tabla 6) fue mayor al que se encontró en la guayaba, cuando se analizó el mismo número de loci (12 alelos para la guayaba). Esto podría indicar que hay más variabilidad en el guayabillo que en la guayaba. Sin embargo, cuando se analizó los 17

primers que presentaron amplificación en guayaba, se encontró un total de 44 alelos (Ponce, MJ, 2014). El número más alto de alelos en guayaba puede deberse a que se analizaron más loci que en guayabillo, por lo tanto, se sugiere analizar un mayor número de loci en las dos especies para tener información más clara sobre la diversidad genética presente en estas especies.

8.1 Flujo Génico

Para obtener información acerca de la diversidad genética de las poblaciones, se analiza distintos índices como la riqueza alélica, la heterocigosidad esperada, el nivel de polimorfismo de los marcadores utilizados, entre otros. La riqueza alélica permite cuantificar el número total de alelos diferentes en cada uno de los loci analizados (Eguiarte, L y otros, 2010). El nivel de polimorfismo indica el número de loci variables dentro de todos los loci analizados. La heterocigosidad esperada determina la proporción de individuos heterocigotos para cada locus analizado. Los valores más altos de heterocigosidad esperada indican que la diversidad genética es alta ya que hay más individuos heterocigotos en la muestra, y por lo tanto hay más variabilidad de alelos. Existen otros índices importantes que permiten evaluar la diversidad genética interpoblacional. Por ejemplo, la distancia genética permite estimar que tan lejanas se encuentran las poblaciones entre sí en base a sus frecuencias alélicas. Los estadísticos F permiten medir la distancia genética entre las subpoblaciones también en base a las frecuencias alélicas (Eguiarte, L y otros, 2010). El estadístico F_{st} obtenido para el guayabillo indica que existe un alto flujo génico entre los individuos de las localidades muestreadas (Tabla 5). . El flujo génico es la incorporación de genes foráneos al pool genético de una o más poblaciones dentro de una especie. "Funciona como una fuerza evolutiva cohesiva, manteniendo como un todo evolutivo a las especies y evitando que sean demasiado diferentes cada una de las poblaciones que la forman" (Eguiarte, L y otros, 2010). La zona

muestreada fue la parte sur de la Isla San Cristóbal en Galápagos y las distancias geográficas entre las diferentes localidades eran cortas. Varios estudios en ecosistemas insulares han concluido que los sistemas de islas por lo general presentan una pequeña área de tierra y por lo tanto las especies endémicas se distribuyen simpátricamente o de forma adyacente y estas condiciones inducen fácilmente al flujo de genes y al apareamiento al azar entre poblaciones de la misma especie (Setoguchi, H & Watanabe, I, 2000). Estas características de los sistemas insulares los hacen buenos escenarios en los que investigar el flujo de genes entre las poblaciones de especies endémicas. Por ejemplo, las Islas de Bonin y las Islas Ryukyu en Japón son sistemas insulares en los que hay especies endémicas del género *Ilex*, *Ficus* y *Symplocos*. Estos géneros aparecen en la especiación insular tanto en las islas Bonin como en las Ryukyu (Setoguchi, H & Watanabe, I, 2000). En este estudio se encontró que existía flujo génico en las especies endémicas simpátricas del género *Ilex* en ambas islas (Setoguchi, H & Watanabe, I, 2000) Comparando con estos resultados, se puede asumir que el guayabillo presenta alto flujo génico debido a que es una especie dentro de un ecosistema insular donde las condiciones permiten que las especies y poblaciones simpátricas y ubicadas cercanamente (como lo están los individuos de guayabillo), presenten un alto flujo de genes. El menor valor (0.018) que indicaría el mayor flujo génico encontrado (Tabla 5) se obtuvo entre las localidades de Camino a Opuntias y Perimetral.

La distribución de la población en las especies insulares endémicas suele ser discontinua debido a que el océano actúa como una barrera y aísla a las poblaciones que se encuentran en un espacio de tierra de las que se encuentran en otro espacio. Por lo tanto, el flujo génico tiende a ocurrir de manera más fácil entre las poblaciones que se encuentran en la misma isla que entre las poblaciones de las diferentes islas (Maki, M, 2001). En base a estos hechos, se podría esperar que la población de guayabillo analizada en este estudio, sea diferente a la población de guayabillo presente en diferentes islas del archipiélago (Santa

Cruz, Isabela) (Maki, M, 2001), asunto que habrá que resolver en las etapas siguientes de este proyecto donde se analizará la diversidad genética del guayabillo en las islas Santa Cruz e Isabela.

Adicionalmente, para comprender cómo se está llevando a cabo la dispersión de semillas y polen de guayabillo y así entender el flujo de genes existente, se debe estudiar la biología y ecología de esta especie. En un estudio previo en la Isla San Cristóbal se evaluaron los posibles dispersores de semillas de la guayaba y se encontró que hay varias especies de animales que desempeñan esta función. Se encontró que los caballos, las vacas, los insectos y varias especies de aves son dispersores de semillas de guayaba y que por lo tanto, la distribución es amplia (Herrera, X, 2013). No se puede asumir que los dispersores de semillas del guayabillo son los mismos que los de la guayaba, sin embargo, se puede tomar la información que se tiene de la especie invasora como base para realizar estudios en la especie endémica.

8.2 Diversidad Genética

La H_e (heterocigosidad esperada) (Tabla 3) obtenida para el guayabillo ($H_e=0.467$) permite concluir que esta especie tiene una diversidad genética moderada. Para la guayaba, la heterocigosidad esperada (0.205, Anexo 6) permite concluir que su diversidad genética es baja (Ponce, MJ, 2014). Se considera que las especies insulares endémicas son pequeñas en términos de tamaño de población y que por lo general, tienen una baja diversidad genética (Setoguchi, H & Watanabe, I, 2000) En este estudio preliminar se encontró que la diversidad genética de la especie endémica es más alta que la de la especie invasora presentada en un estudio previo (Ponce, MJ, 2014). Se puede asumir que la diversidad genética de la guayaba es más baja que la del guayabillo ya que la guayaba es una especie

invasora que colonizó la isla iniciando por una pequeña muestra de guayaba que se introdujo desde el continente. Debido al efecto fundador y al cuello de botella, no se espera que la guayaba invasora en la Isla San Cristóbal, presente una alta diversidad genética (Lee, CE, 2002). A pesar de que se considere que las especies invasoras tienen baja diversidad genética, Frankham (2007) explicó que la diversidad genética de las poblaciones endémicas es menor a la de las no endémicas y sugiere que el efecto fundador de las invasoras es menos importante que las condiciones que proporcionan los sistemas de isla y que provocan que las especies insulares tengan baja diversidad genética (poblaciones pequeñas, aisladas, entre otras). En este caso, se podría pensar que el efecto fundador de la especie invasora sí es muy importante ya que esta especie presenta una diversidad genética baja. Sin embargo, no se puede concluir nada debido a que no se conoce información acerca de la diversidad genética de ninguna de las dos especies antes de la introducción a las islas.

Varios estudios acerca de la variabilidad genética de especies vegetales han revelado una relación fuerte entre el nivel de diversidad genética en una especie y su distribución geográfica. En términos generales, las especies que tienen una amplia distribución mantienen considerablemente niveles más altos de diversidad genética tanto a nivel poblacional como de especie; probablemente a causa del aislamiento de las poblaciones o las fuerzas selectivas que existen a lo largo del área de distribución (Dodd, S & Helenurm, K, 2002). Sin embargo, los estudios acerca de la estructura genética de las especies endémicas han obtenido resultados poco homogéneos. No todas las especies raras y endémicas tienen bajos niveles de diversidad genética; incluso algunas especies tienen más altos niveles de diversidad que otras especies que tienen una amplia distribución. Esto permite concluir y establecer la importancia de factores como características de la historia de cada especie, acontecimientos recientes de fluctuaciones de las poblaciones, entre otros, ya que pueden afectar la distribución y el nivel de variación genética en especies vegetales (Dodd, S & Helenurm, K, 2002)

En un estudio acerca de los impactos de la especie invasora *Mikania micrantha* en varias islas del Pacífico se realizaron análisis genéticos moleculares en poblaciones invasoras introducidas y se vio que esta especie presenta una considerable diversidad genética en una variedad de ecosistemas geográficamente distintos (Day, M y otros, 2016). Esto permite asumir, que al ser la guayaba una especie introducida desde el continente hace menos de 200 años (Walsh, SJ y otros, 2008; Ponce, MJ y otros, 2014), su diversidad es baja debido al efecto fundador y al cuello de botella que ha pasado durante su colonización (Lee, CE, 2002). Los valores de distancia genética permiten determinar que hay una mayor distancia entre los individuos de la localidad Centro de Reciclaje y Cerro Verde. Adicionalmente, la menor distancia se encuentra entre las localidades Centro de Reciclaje y Camino a Opuntias. En base a los resultados que presenta el Índice de Mantel (Fig. 3), en el que se obtuvo un valor de $R=0.042$, se concluye que no hay una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica.

8.3 Estructura Poblacional

En este estudio también se buscó identificar la estructura poblacional del guayabillo en San Cristóbal. Se realizó un Análisis de Coordenadas Principales para observar las posibles agrupaciones de los individuos de guayabillo de las diferentes localidades muestreadas. Adicionalmente, se obtuvo resultados para el análisis de estructura poblacional realizado mediante el software STRUCTURE basado en estadística bayesiana. Estos dos resultados (Figuras 2 y 4) permiten concluir que no hay una estructura poblacional establecida entre los individuos de guayabillo analizados. Para analizar la estructura de las poblaciones se debe determinar la cantidad de flujo génico que está ocurriendo. "El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo

génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente" (Slatkin, M, 1994). Por lo tanto, los resultados obtenidos en el PCoA y en el análisis de estadística bayesiana permiten corroborar la existencia de alto flujo génico entre las poblaciones analizadas de guayabillo. Este flujo génico permite que evolucionen juntas las poblaciones y por lo tanto no se observa una estructura determinada, entonces se asume que los individuos de guayabillo analizados forman parte de una misma población. Es importante entender acerca de la biología, ecología y distribución del guayabillo para poder afirmar que se trata de una sola población, sin embargo, los resultados que se han obtenido en este estudio sustentan esta idea.

8.4 Análisis de Híbridos

Uno de los análisis más importantes dentro de este estudio es ver si han ocurrido eventos de hibridación entre la especie endémica y la introducida. Los sistemas insulares son escenarios ideales para la especiación y diversificación de plantas. Se ha visto que en este tipo de ecosistemas hay muchos casos de hibridación y/o introgresión con especies insulares y estos procesos son considerados factores importantes en su evolución. Los sistemas insulares generalmente presentan una pequeña área de tierra y las especies endémicas se encuentran distribuidas simpátricamente o adyacentemente (Setoguchi, H & Watanabe, E, 2000). Por lo general, los procesos de hibridación e introgresión entre varias especies, suelen ocurrir en regiones de simpatría (Montgomery, S, 1985). Las condiciones de distribución de especies en las islas permiten que haya un alto flujo de genes causa de la facilidad de dispersión de las semillas y el polen mediante distintos agentes. Por lo general, las poblaciones de especies insulares son de pequeño tamaño, y su distribución no es muy amplia (Curtis, C & Strong, D, 1997), como es el caso del guayabillo en la isla San Cristóbal. La guayaba introducida en San

Cristóbal se encuentra distribuida a lo largo de la isla y hay individuos de esta especie ubicados geográficamente muy cerca de los individuos de guayabillo, por lo tanto, es factible pensar que existan híbridos entre estas dos especies, sin embargo, no se puede afirmar esto debido a que no se conoce acerca del comportamiento reproductivo del guayabillo. Adicionalmente, una de las principales amenazas a la conservación de las especies endémicas y nativas es la introgresión con especies introducidas (Levin, D y otros, 1996). La hibridación entre especies nativas e introducidas puede ser común, sin embargo es necesario realizar estudios con marcadores moleculares para confirmar que este fenómeno es el que está ocurriendo (Curtis, C & Strong, D, 1997). Por lo tanto, es importante evaluar posibles eventos de hibridación entre la especie endémica *P. galapageium* y la especie invasora *P. guajava* en las islas Galápagos.

En este estudio preliminar, mediante la utilización del método estadístico bayesiano (Figuras 5 y 6), se encontró que no existen híbridos entre las dos especies (endémica e invasora) en las localidades muestreadas de la isla San Cristóbal. Sin embargo, en base a los resultados obtenidos en varios estudios realizados en ecosistemas muy similares; no se descarta la posibilidad de que sí se den eventos de hibridación en Galápagos entre *P. galapageium* y *P. guajava*. En la Isla Socorro, en México, se realizó un estudio que sirve como base para entender la importancia de continuar analizando los eventos de hibridación entre la guayaba y el guayabillo en Galápagos. En la Isla Socorro, se evaluó la posibilidad de que existan híbridos entre la especie endémica *Psidium socorrense* y *Psidium. sp. aff. sartorianum* (una especie que presenta características similares a la especie continental *P. sartorianum*) utilizando marcadores moleculares RAPD y marcadores morfológicos. Se realizaron varios análisis estadísticos como ANOVA, se obtuvo el índice de hibridación Anderson utilizando datos morfológicos y el índice de híbridos "maximum-likelihood" utilizando el programa Hardig-Hybrid y se determinó la existencia de híbridos (López-

Caamal, A y otros, 2014). Otro estudio realizado en la isla Maui en el archipiélago de Hawaii evaluó una población de posibles híbridos entre la especie endémica *Rubus hawaiiensis* y la especie *Rubus rosifolius*. El objetivo de este estudio era caracterizar de manera molecular los eventos de hibridación mediante la utilización de marcadores morfológicos y marcadores moleculares RAPD. Este estudio recalca el incremento en la frecuencia y los efectos negativos de la hibridación entre especies endémicas y especies no endémicas en ecosistemas insulares (Randell, R y otros, 2004).

En el caso del guayabillo, para poder entender si han ocurrido o no eventos de hibridación se necesita estudiar y entender la biología de la especie endémica. De acuerdo a la información que se tiene, las épocas de floración de la guayaba y guayabillo no son las mismas, y esto podría ser la explicación para no encontrar eventos de hibridación entre estas especies en Galápagos. Sin embargo, hacen falta estudios más amplios sobre la biología del guayabillo para llegar poder concluir sobre este tema (Valdebenito, H, Comunicación Personal 2016).

El análisis de eventos de hibridación es un tema de profunda relevancia en el caso del guayabillo y la guayaba en San Cristóbal debido a que las especies insulares tienen algunas características que promueven la hibridación con especies cercanamente relacionadas (tamaño pequeño de población, baja diversidad, aislamiento). En el caso del guayabillo, a pesar de no tener una diversidad genética baja, es una especie endémica insular que está cohabitando con una especie invasora de su mismo género, y por lo tanto, podrían existir eventos de hibridación. Adicionalmente, en San Cristóbal, se han encontrado individuos que fenotípicamente son considerados híbridos entre guayaba y guayabillo (Valdebenito, H, 2016), por lo tanto, es fundamental realizar un análisis molecular en el que se incluya a estos individuos.

Las especies insulares tienen barreras genéticas débiles, por lo tanto, si existen alteraciones en los ecosistemas, como introducción de animales, introducción de especies invasoras, disturbios causados por el ser humano como tala de árboles, entre otros; es probable que se den eventos de hibridación entre especies endémicas y sus parientes cercanos. La hibridación entre especies endémicas y sus congéneres cercanos puede amenazar a la especie endémica a causa de la asimilación genética si la otra especie es superior numérica o reproductivamente (López-Caamal, A y otros, 2014). Adicionalmente, la introgresión puede causar la pérdida del pool genético de las especies parentales y en casos extremos, esto puede causar la extinción de la especie endémica. Existen también efectos negativos a nivel ecológico ya que los híbridos amenazan a la especie endémica ya que compiten por recursos. En un estudio realizado en 1997 se encontró que la especie *Spartina foliosa* nativa de California, forma híbridos con la especie introducida *Spartina alterniflora* en las marismas de San Francisco. Se vio que los híbridos tienen mayor fitness y que causan la disminución de la diversidad genética de la especie nativa (Vila, M y otros, 2000). Debido al gran impacto de los eventos de hibridación sobre las especies endémicas insulares, es fundamental identificar de manera correcta a los individuos híbridos. Por lo general, las características morfológicas intermedias entre parentales eran consideradas la primera evidencia de hibridación, sin embargo se requiere pruebas moleculares para la identificación de híbridos (Curtis, C & Strong, D, 1997). En el caso del guayabillo, a pesar de no haber encontrado eventos de hibridación en este estudio, se sugiere continuar estudiando la posibilidad de existencia de posibles individuos híbridos. Se debe entender la biología del guayabillo para comprender más acerca de los posibles sucesos de hibridación, sin embargo, se explica en la teoría que las especies insulares son más propensas al cruzamiento que sus congéneres continentales porque tienden a tener una diversidad genética más baja y a tener barreras de cruzamiento más débiles (Kanupriya, P y otros, 2011). También se conoce que las plantas insulares suelen tener poca

diferenciación en la arquitectura floral y que esto facilita la polinización cruzada entre especies (Levin, D y otros, 1996). La presencia de polinizadores no especializados también contribuye a la polinización cruzada. Adicionalmente, en las islas tropicales, los períodos largos de floración también promueven la hibridación (Levin, D y otros, 1996). Gracias al conocimiento general acerca de los eventos de hibridación de especies insulares, surge la necesidad de entender los períodos de floración del guayabillo, conocer sus polinizadores y entender su biología, para poder descartar o aceptar la posibilidad de hibridación con la especie invasora.

9. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este estudio preliminar acerca de la diversidad genética del guayabillo son fundamentales ya que permiten tener información que sirve como base para futuros estudios en este tema.
- No es posible llegar a conclusiones definitivas sobre eventos de hibridación, diversidad genética ni estructura poblacional, debido a la falta de información acerca de la biología, distribución, ecología, entre otros, de la especie endémica.
- Se obtuvo un porcentaje de transferibilidad de primers heterólogos de 39.1% y fue posible obtener información para 69 de los 77 individuos muestreados.
- La diversidad genética que se encontró para el guayabillo es moderada y es más alta que la diversidad de la guayaba en la isla. Se obtuvo un total de 25 alelos para los 7 loci analizados en los 69 individuos de guayabillo.
- Los índices obtenidos permiten asumir que existe alto flujo génico (F_{st}) entre los individuos de guayabillo y que no existe una correlación entre la distancia genética y la distribución geográfica (Índice de Mantel).
- No se encontró una estructura poblacional para los individuos de guayabillo analizados y se puede asumir que se trata de una sola población con alto flujo génico y pocos individuos.
- No se encontró la presencia de híbridos en la población analizada, sin embargo se sugiere continuar con los estudios sobre este tema.

10. RECOMENDACIONES

- Diseñar primers homólogos para guayabillo.
- Realizar estudios de diversidad genética del guayabillo en otras islas de Galápagos para comparar con los resultados obtenidos en San Cristóbal y poder tener una idea más clara de lo que ha sucedido con el guayabillo.
- Realizar estudios acerca de la biología del guayabillo para poder entender de manera más clara que es lo que está sucediendo con esta especie.
- Continuar con estudios de hibridación de individuos de guayaba y guayabillo incluyendo en el análisis a los individuos que fenotípicamente son considerados posibles híbridos.
- Utilizar otros métodos de análisis estadístico (ANOVA, Anderson hybrid index, maximum likelihood hybrid index) utilizados en estudios similares para evaluar los posibles híbridos.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Benbouza, H., Jacquemin, J. M., Baudoin, J. P., & Mergeai, G. (2006). Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnonology, Agronomie, Society and Evironment* , Vol 10: 77-81.
- Brewington, L. (2011). The Politics of Invasion: Defining and Defending the Natural, Native and Legal in the Galápagos Islands of Ecuador. *Chapel Hill* , 111-113.
- Chiriboga, R., Fonseca, B., & 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* , 1-86.
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A., & Torres, M. (2015). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *ELSEVIER* , 14-21.
- Curtis, C., & Strong, D. (1997). Hybridization between introduced smooth cordgrass. *American Journal of Botany* , 607-611.
- Day, M., Clements, D., Gile, C., Senaratne, W., Shen, S., & Zhang, L. W. (2016). Biology and Impacts of Pacific Islands Invasive Species. 13. *Mikania micrantha* Kunth (Asteraceae). *Pacific Science* , 257-285.
- Dodd, S., & Helenurm, K. (2002). Genetic Diversity in *Delphinium variegatum* (Ranunculaceae): A Comparison of Two Insular Endemic Subspecies and Their Widespread Mainland Relative. *American Journal of Botany* , Vol. 89: 613-622.
- Eguiarte, L., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Universidad Nacional Autónoma de México* , 2-28.
- Frankham, H. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity* , 311-327.
- Freider, D. (1981). *Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular*. Madrid: Reverte.
- Funk, J., & Throop, H. (2010). Enemy release and plant invasion: patterns of defensive traits and leaf damage in Hawaii. *Oecologia* , Vol. 162, No. 4: 815-823.
- González, D., Palacios, N., & Tohme, J. (1995). *Protocolos para Marcadores Moleculares*. Cali: CIAT.
- Grünwald, N., Kamvar, Z., & Everhart, S. (2008). AMOVA. *Population Genetics in R* , 2-10.
- Hennink, S., & Zeven, A. C. (1990). The Interpretation of Nei and Shannon Weaver within population variation indexes. *Euphytica* , Vol.51: 235-240.

- Herrera, X. (2013). Posibles dispersores de *Psidium guajava* en la Isla San Cristóbal, Galápagos-Ecuador. *Universidad San Francisco de Quito* , 8-20.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. (1996). The Red List of Threatened Species. *The Red List of Threatened Species* .
- 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: 39-58.
- Jager, H. (17 de Octubre de 2016). Número de Especies Introducidas en las Islas Galápagos. (S. Ponce, Entrevistador)
- Jager, H., Tye, A., & Kowarik, I. (2007). Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galápagos. *Biological Conservation* , 297-307.
- Jaramillo Díaz, P., & Guézou, A. (2013). CDF Checklist of Galapagos Vascular Plants- FCD Lista de especies de Plantas Vasculares de Galápagos. *Charles Darwin Foundation* .
- Kanupriya, P., Latha, M., Aswath, C., Reddy, L., Padmakar, B., Vasugi, C., y otros. (2011). Cultivar Identification and Genetic Fingerprinting of Guava (*Psidium guajava*) Using Microsatellite Markers. *Internation Journal of Fruit Science* , Vol 11: 184-196.
- Karcher, S. (1995). *Molecular Biology. A Project Approach*. New York: Science.
- Kruckebert, A., & Rabinowitz, D. (1985). Biological Aspects of Endemism in Higher Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* , Vol. 16: 447-479.
- Lee, C. E. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution* , 386-391.
- Levin, D., Ortega, F., & Jansen, R. (1996). Hybridization and the Extinction of Rare Plant Species. *Conservation Biology* , Vol.10: 10-16.
- López, A., Cano-Santana, Z., Jiménez, J., Ramírez, R., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Is the insular endemic *Psidium socorrense* (Myrtaceae) at risk of extinction through hybridization? *Plant Systematics Evolution* , 1959-1972.
- López-Caamal, A., Cano-Santana, Z., Jiménez-Ramírez, J., Ramírez-Rodríguez, R., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Is the insular endemic *Psidium socorrense* (Myrtaceae) at risk of extinction through hybridization? *Plant Systematics Evolution* , 1960-1970.
- Magee, J., McMullen, C. K., Reaser, J. K., Spitzer, E., Struve, S., Tufts, C., y otros. (2001). Green Invaders of the Galapagos Islands. *Science* , Vol. 294: 1279-1280.

- Maki, M. (2001). Genetic Differentiation within and among Island Populations of the Endangered Plant *Aster miyagii* (Asteraceae), an Endemic to the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* , Vol. 88: 2189-2194.
- Mauchamp, A. (1997). Threats from Alien Plant Species in the Galapagos Islands. *Conservation Biology* , 260-263.
- McMullen, C. K. (1999). Flowering Plants of the Galapagos. *Uno Eliasson* .
- Mesa, L., Rivera, M., & Romero, J. (2011). Descripción General de la Inferencia Bayesiana y sus Aplicaciones en los procesos de Gestión. *La simulación al servicio de la academia* , 2-8.
- Montgomery, S. (1985). Gene Flow in Natural Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* , Vol. 16: 393-430.
- Peakall, R. a. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* , 28, 2537-2539.
- Perrier, X., & Jacquemoud-Collet, J. (2006). DARwin software. *CIRAD* .
- Picó, M., & Pérez de Castro, A. (2012). Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores RAPD. *Universidad Politécnica de Valencia* .
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el índice de Shannon y la Riqueza. *INCI* , 2-8.
- Ponce, M. J. (2014). Estudio preliminar de la diversidad genética de la guayaba, *Psidium guajava*, en 6 localidades de la isla San Cristóbal, Ecuador . *Tesis de Pregrado. USFQ* , 50-68.
- Porter, D. (1969). *Psidium* (Myrtaceae) in the Galápagos Islands. *Ann. Missouri Bot. Gard* , Vol 55: 368-371.
- Pritchard, J. (1998). STRUCTURE software. *Stanford University* .
- Randell, R., Howarth, D. G., & Morden, C. W. (2004). Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawaii. *Conservation Genetics* , Vol 5: 217-230.
- Schofield, E. K. (1989). Effects of introduced plants and animals on island vegetation; examples from the Galapagos archipelago. *Conservation Biology* , 227-238.
- Setoguchi, H., & Watanabe, I. (2000). Intersectional Gene Flow between Insular Endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany* , Vol.87: 793-810.

- Shagai-Marroof, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* , 8014-8018.
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecological Genetics* , 3-5.
- Tye, A. (2002, 2004, 2006). Revisión del estado de amenazas de la flora endémica de Galápagos. Informe Galápagos. *Fundación Natura* , 116-122.
- Valdebenito, H. (Junio de 2016). (S. Ponce, Entrevistador)
- Valdez-Infante, J., Nerdo, N., Bautista, M., Ortiz, M., Quiroz, A., Sánchez, L., y otros. (2010). Microsatellites developed in guava (*Psidium guajava* L.) and their usefulness in evaluating diversity in the Myrtaceae family. *Revista Colombiana de Biotecnología* , Vol. XII No. 1: 65-70.
- Vila, M., Weber, E., & D'Antonio, C. (2000). Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological Invasions* , 207-217.
- Walsh, S. J., Cleary, A. M., Mena, C. F., Shao, C., Tuttle, Y., González, J. P., y otros. (2008). QuickBird and Hyperion Data Analysis of an Invasive Plant Species in the Galapagos Islands of Ecuador: Implications for Control and Land Use Management. *Remote Sensing of Environment* , Vol. 112: 1930-1947.
- Wiggins, I., & Porter, D. (1971). Flora of the Galapagos Islands. *Stanford University Press* .

12. TABLAS

Tabla 1: Primers Microsatélites utilizados para la amplificación de muestras de guayabillo

Loci	Secuencia de Primer (5'-3')	T. de annealing (°C)	No. de Alelos encontrados	Tamaño encontrado (pb)
mPgCIR 02	F: AGTGAACGACTGAAGACC R: ATTACACATTCAGCCACTT	56	3	204-211
mPgCIR 05	F: GCCTTTGAACCACATC R: TCAATACGAGAGGCAATA	56	4	152-189
mPgCIR 11	F: TGAAAGACAACAAACGAG R: TTACACCCACCTAAATAAGA	61	3	239-245
mPgCIR 13	F: CCTTTTCCCGACCATTACA R: TCGCACTGAGATTTTGTGCT	55	4	210-223
mPgCIR 17	F: CCTTTCGTCATATTCACCTT R: CATTGGATGGTTGACAT	53	4	206-220
mPgCIR 18	F: TAAGCTGCATGTGTGC R: ATGGCTTTGGATGAAA	53	3	209-224
mPgCIR 21	F: TGCCCTTCTAAGTATAACAG R: AGCTACAAACCTTCCTAAA	57	4	153-168

Fuente: (Kanupriya, y otros, 2011)

Tabla 2: Parámetros de diversidad genética obtenidos para individuos de guayabillo en 7 localidades de la isla San Cristóbal, Galápagos.

Localidad	No. Alelos diferentes, por población	No. alelos privados	Heterocigosidad Observada	Heterocigosidad Esperada	Índice de Shannon
Camino a Opuntias	2.429 ±0.202	0	0.619± 0.116	0.467 ± 0.030	0.467 ± 0.030
Perimetral	2.857 ±0.261	0	0.629± 0.081	0.540 ± 0.033	0.540 ± 0.033
Cerro Gato	3.000 ±0.218	1	0.377 ± 0.104	0.482 ± 0.064	0.482 ± 0.064
Galapaguera	2.857 ± 0.261	1	0.527 ± 0.118	0.542 ± 0.042	0.542 ± 0.042
Centro de Reciclaje	2.429 ±0.297	1	0.571± 0.146	0.429 ±0.056	0.429 ±0.056
Cerro Verde	2.429 ±0.202	0	0.286 ± 0.059	0.411 ± 0.054	0.411 ± 0.054
Las Goteras	2.714 ±0.184	0	0.297 ± 0.100	0.399 ± 0.051	0.399 0 ± 0.051

Tabla 3: Índices globales de diversidad genética obtenidos para las localidades muestreadas de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos

Índice de Shannon	0.761 ± 0.033
Heterocigosidad observada	0.472 ± 0.043
Heterocigosidad esperada	0.467 ± 0.019

Tabla 4: Distancias genéticas de Nei obtenidas para individuos analizados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos

Camino a Opuntias	Perimetral	Cerro Gato	Galapaguera	Centro de Reciclaje	Cerro Verde	Las Goteras	
0.000							Camino a Opuntias
0.039	0.000						Perimetral
0.317	0.379	0.000					Cerro Gato
0.093	0.093	0.421	0.000				Galapaguera
0.037	0.052	0.510	0.098	0.000			Centro de Reciclaje
0.381	0.460	0.122	0.357	0.535	0.000		Cerro Verde
0.192	0.252	0.305	0.142	0.209	0.239	0.000	Las Goteras

Tabla 5: Valores FST obtenidos para individuos de guayabillo analizados en la Isla San Cristóbal, Galápagos

Camino a Opuntias	Perimetral	Cerro Gato	Galapaguera	Centro de Reciclaje	Cerro Verde	Las Goteras	
0.000							Camino a Opuntias
0.018	0.000						Perimetral
0.127	0.127	0.000					Cerro Gato
0.038	0.033	0.132	0.000				Galapaguera
0.022	0.028	0.192	0.047	0.000			Centro de Reciclaje
0.161	0.167	0.067	0.143	0.222	0.000		Cerro Verde
0.093	0.106	0.126	0.066	0.098	0.124	0.000	Las Goteras

Tabla 6: Tabla comparativa de valores obtenidos para guayaba y guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos.

	Porcentaje de Transferibilidad de Primers	Número total de alelos encontrados	Heterocigosidad Esperada
Guayabillo	39.13	25	0.467
Guayaba	73.91	44	0.205

13. FIGURAS

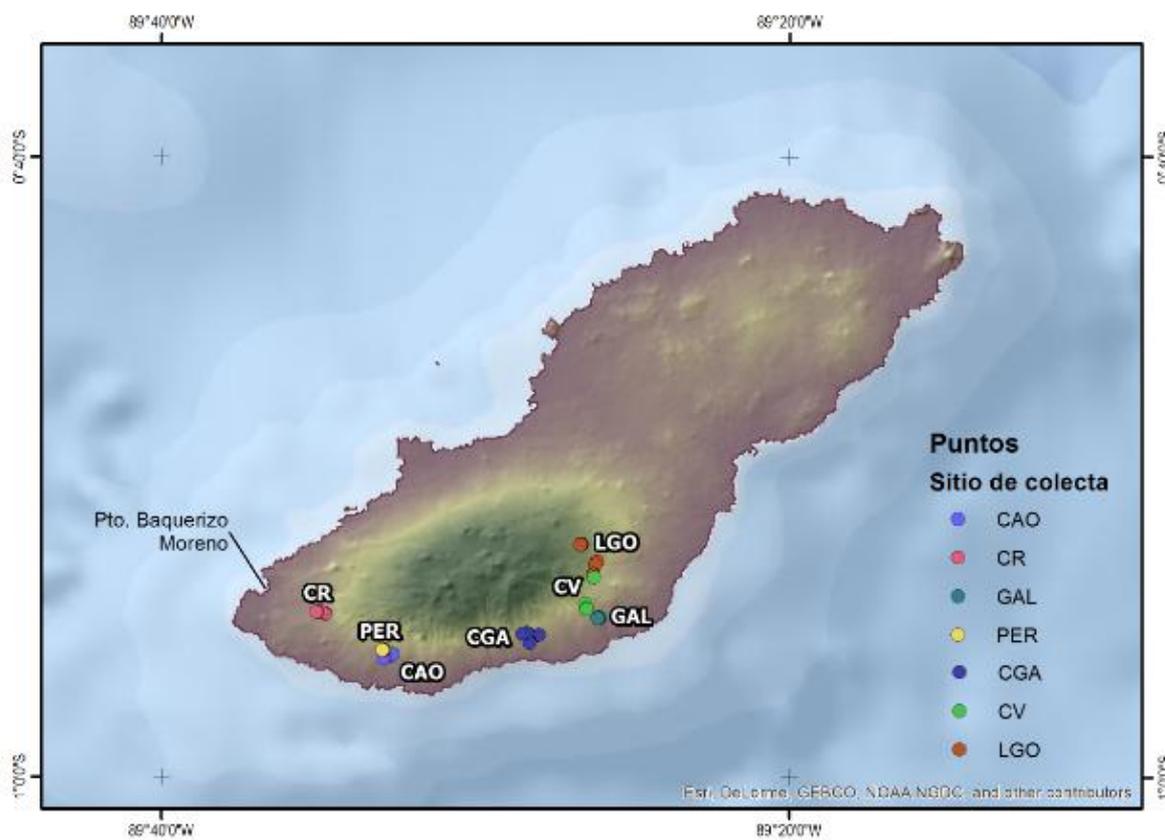


Figura 1: Mapa de las localidades muestreadas en el sur de la isla San Cristóbal, Galápagos

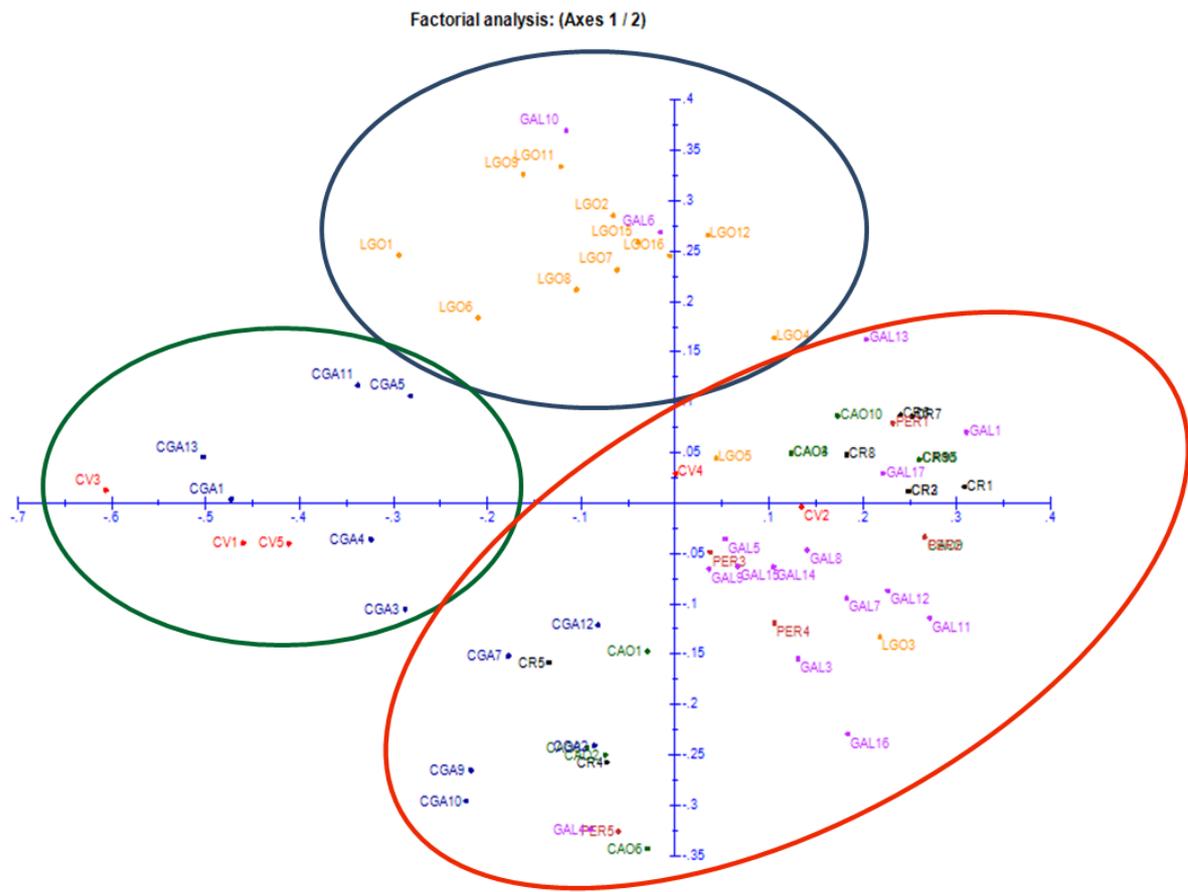


Figura 2: PCoA de individuos de guayabillo de la Isla San Cristóbal, Galápagos. Grupo 1: Cuadrantes 1 y 2 parte superior, individuos de la localidad Las Goteras (LGO), Galapaguera (GAL) y Cerro Gato (CGA11 y CGA5). Grupo 2: cuadrantes 2 y tres lado izquierdo, individuos de la localidad Cerro Gato, Cerro Verde (CV), Galapaguera, Perimetral (Per), Camino a Opuntias (CaO), Centro de Reciclaje (CR). Grupo 3: Cuadrantes 1 y 4 lado derecho, individuos de la localidad Las Goteras (LGO4), Galapaguera, Cerro Verde, Centro de Reciclaje, Perimetral.

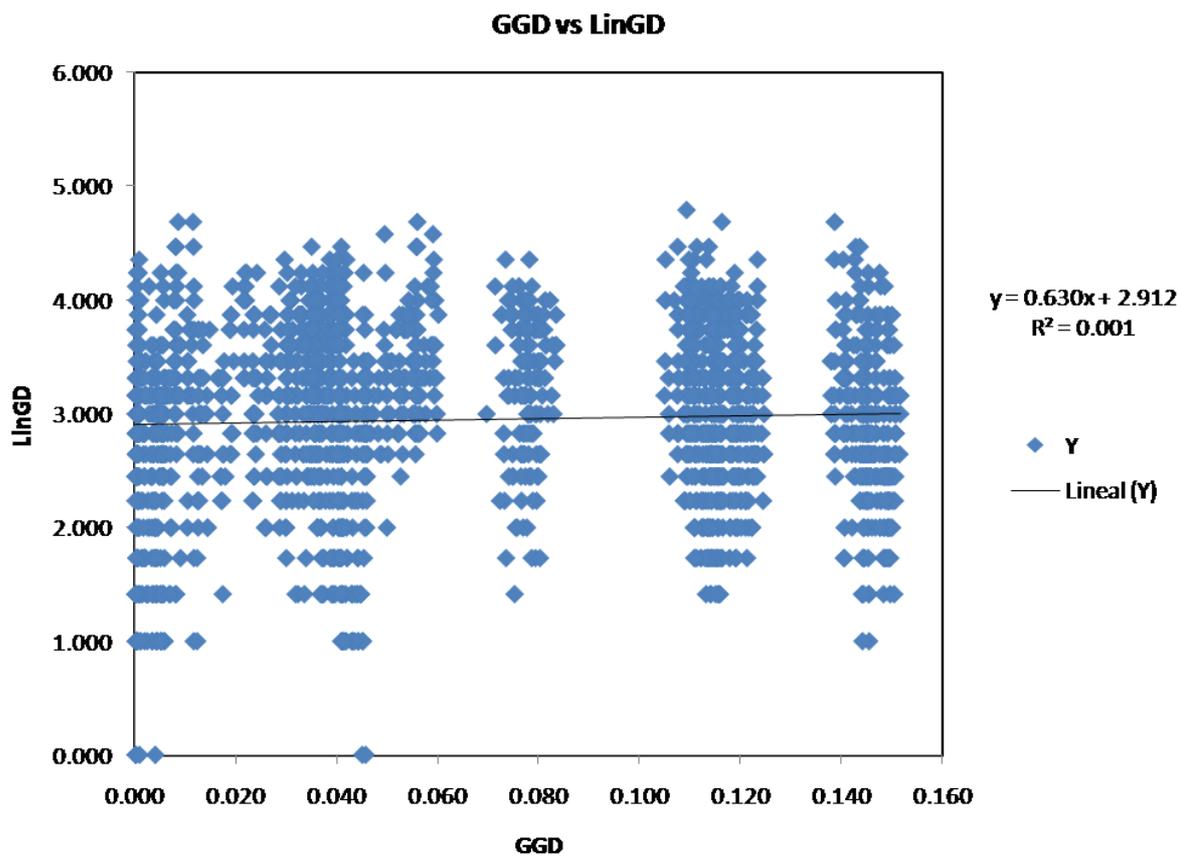


Figura 3: Índice de Mantel para individuos analizados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos.

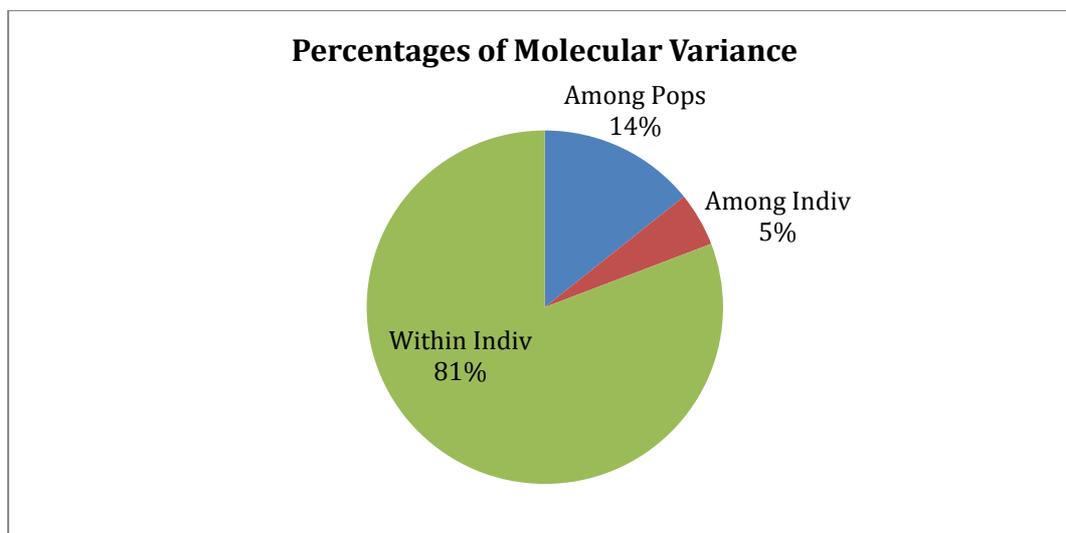


Figura 4: Porcentajes de la Varianza Molecular obtenida para los individuos de guayabillo analizados en la Isla San Cristóbal, Galápagos

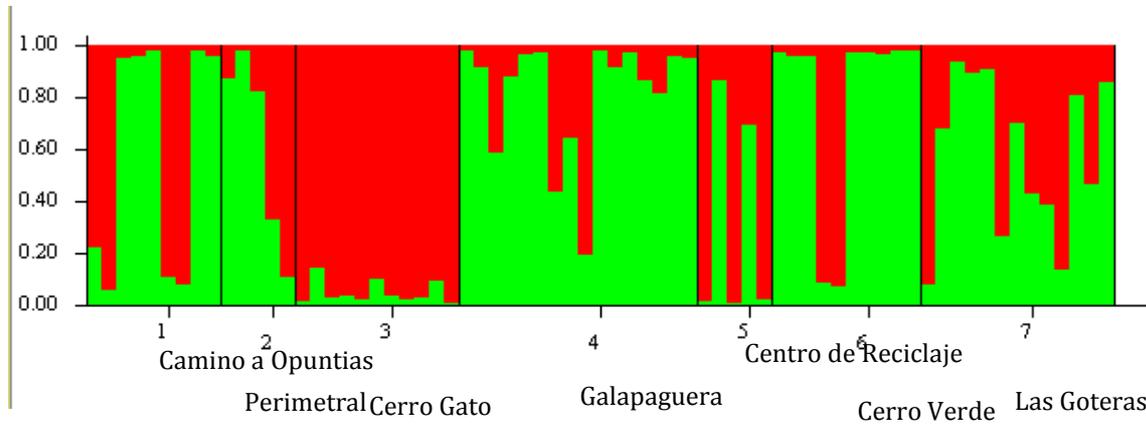


Figura 5: Gráfico de estructura poblacional del guayabillo utilizando un k óptimo de 2

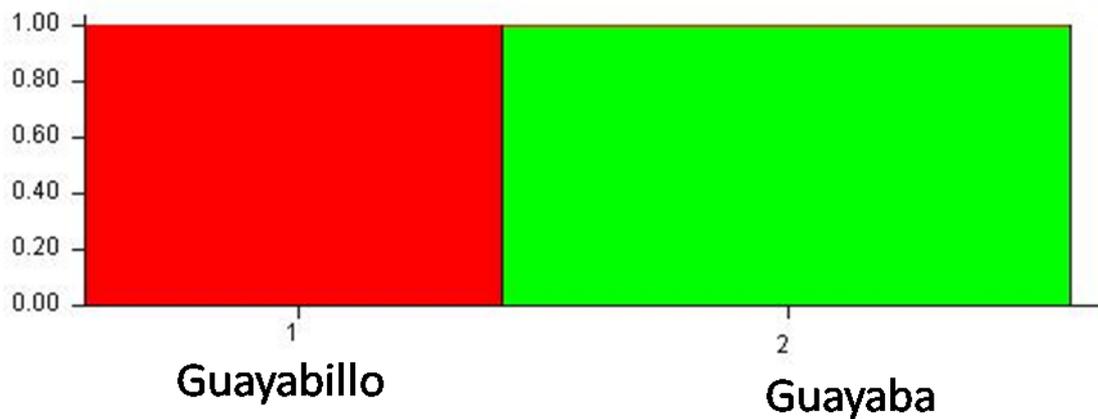


Figura 6: Gráfico obtenido para el análisis de híbridos entre individuos de guayaba y guayabillo utilizando $k=2$, se observa un grupo de individuos de guayabillo y otro grupo separado de individuos de guayaba, no se observa la presencia de híbridos

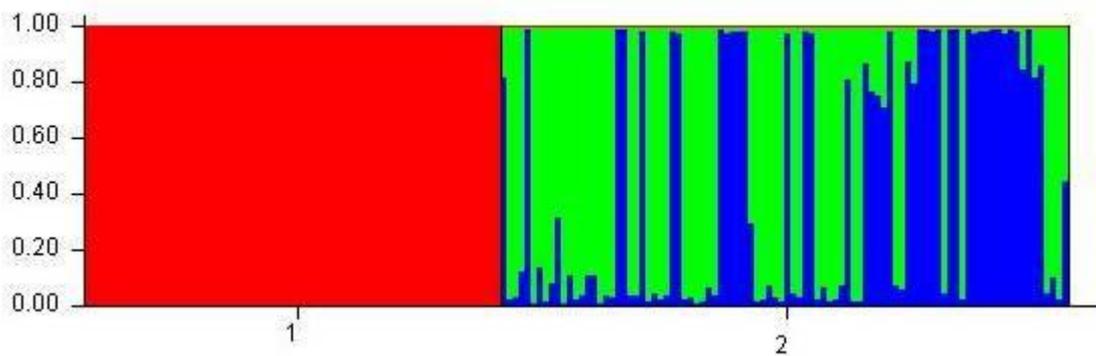


Figura 7: Gráfico obtenido para el análisis de híbridos entre individuos de guayaba y guayabillo utilizando $k=3$, se observa un grupo de individuos de guayabillo (rojo) y un grupo de individuos de guayaba con dos posibles orígenes, no se observa presencia de híbridos

15. ANEXOS

Anexo 1: Planta de guayabillo de la localidad Las Goteras (Julio, 2014)



Anexo 2: Tabla de individuos muestreados de guayabillo en la Isla San Cristóbal, Galápagos con coordenadas de las localidades muestreadas.

Localidad	Código	Coordenadas	
		Latitud	Longitud
Centro de Reciclaje	CR1	-0.91207	-89.579901
Centro de Reciclaje	CR2	-0.9120121	-89.579862
Centro de Reciclaje	CR3	-0.9119175	-89.579827
Centro de	CR4	-0.9125458	-89.579878

Reciclaje			
Centro de Reciclaje	CR5	-0.9125628	-89.579758
Centro de Reciclaje	CR6	-0.9115341	-89.581581
Centro de Reciclaje	CR7	-0.9111664	-89.583908
Centro de Reciclaje	CR8	-0.9111745	-89.584023
Centro de Reciclaje	CR9	-0.9115059	-89.584068
Centro de Reciclaje	CR10	-0.911579	-89.584876
Camino a Opuntias	CAO1	-0.9350845	-89.548174
Camino a Opuntias	CAO2	-0.9352212	-89.547388
Camino a Opuntias	CAO3	-0.9353468	-89.546992
Camino a Opuntias	CAO4	-0.9352702	-89.546958
Camino a Opuntias	CAO5	-0.9350514	-89.545699
Camino a Opuntias	CAO6	-0.9352046	-89.545731
Camino a Opuntias	CAO8	-0.9342111	-89.544113
Camino a Opuntias	CAO9	-0.9358971	-89.548826
Camino a Opuntias	CAO10	-0.9362969	-89.548947
Perimetral	PER1	-0.9319128	-89.548232
Perimetral	PER2	-0.9319551	-89.548718
Perimetral	PER3	-0.9319278	-89.548896
Perimetral	PER4	-0.9319709	-89.549156
Perimetral	PER5	-0.9319878	-89.54943
Galapaguera	GAL1	-0.914594	-89.434341
Galapaguera	GAL3	-0.9146405	-89.434361
Galapaguera	GAL4	-0.9144531	-89.434784
Galapaguera	GAL5	-0.9143899	-89.434775
Galapaguera	GAL6	-0.9143391	-89.434759
Galapaguera	GAL7	-0.9143206	-89.434648
Galapaguera	GAL8	-0.9143102	-89.434552
Galapaguera	GAL9	-0.9142306	-89.434502
Galapaguera	GAL10	-0.9142159	-89.434421
Galapaguera	GAL11	-0.9145701	-89.434904

Galapaguera	GAL12	-0.9148845	-89.435103
Galapaguera	GAL13	-0.919467	-89.435451
Galapaguera	GAL14	-0.9198616	-89.435697
Galapaguera	GAL15	-0.9198606	-89.435719
Galapaguera	GAL16	-0.9197937	-89.435724
Galapaguera	GAL17	-0.9197952	-89.435845
Las Góteras	LGO1	-0.874977	-89.443852
Las Góteras	LGO2	-0.8751622	-89.443737
Las Góteras	LGO3	-0.874699	-89.443649
Las Góteras	LGO4	-0.8752171	-89.444097
Las Góteras	LGO5	-0.8746843	-89.444258
Las Góteras	LGO6	-0.8752883	-89.444417
Las Góteras	LGO7	-0.8844977	-89.435706
Las Góteras	LGO8	-0.8843089	-89.43559
Las Góteras	LGO9	-0.8843089	-89.43559
Las Góteras	LGO11	-0.8843089	-89.43559
Las Góteras	LGO12	-0.8859548	-89.436327
Las Góteras	LGO15	-0.8909334	-89.43762
Las Góteras	LGO16	-0.8912091	-89.437536
Cerro Verde	CV1	-0.8929473	-89.437385
Cerro Verde	CV2	-0.9069489	-89.441884
Cerro Verde	CV3	-0.9095748	-89.441176
Cerro Verde	CV4	-0.9096258	-89.44114
Cerro Verde	CV5	-0.9099089	-89.440927
Cerro Gato	CGA1	-0.9241712	-89.469949
Cerro Gato	CGA2	-0.9242048	-89.469541
Cerro Gato	CGA3	-0.9242	-89.469318
Cerro Gato	CGA4	-0.9242337	-89.468536
Cerro Gato	CGA5	-0.9235926	-89.466375
Cerro Gato	CGA7	-0.9237929	-89.471317
Cerro Gato	CGA9	-0.9272276	-89.47121
Cerro Gato	CGA10	-0.9273662	-89.471291
Cerro Gato	CGA11	-0.9280996	-89.471266
Cerro Gato	CGA12	-0.9226867	-89.472683
Cerro Gato	CGA13	-0.9232023	-89.475314

Anexo 3: Concentraciones y volúmenes utilizados en la reacción de PCR para amplificación de SSR de guayabillo

Reactivo	Concentración final	Volumen por reacción (ul)
Agua PCR		13
Buffer	1X	2
MgCl ₂	2mM	0.6
PF	0.2mM	0.4
PR	0.2mM	0.4
BSA	1mg/L	2
dNTPs	200uM	0.4
Taq Platinum	0.5 U	0.2
ADN	20ng/ul	1
Total		20

Anexo 4: Programa de ciclado para amplificación de SSR de guayabillo

Número de ciclos	Paso	Temperatura °C	Tiempo
	Desnaturalización inicial	94	4 minutos
30	Desnaturalización	94	45 segundos
	Annealing	52-61	1 minuto
	Extensión	72	8 minutos

Anexo 5: Tabla de concentraciones de ADN extraído de muestras de guayabillo de siete diferentes localidades en la Isla San Cristóbal, Galápagos

Localidad	Nombre muestra	Concentración ng/uL	260/280	260/230
Centro Reciclaje	CR1	99.3	2.57	0.72
Centro Reciclaje	CR2	32.6	2.16	1.03
Centro Reciclaje	CR3	68.6	2.12	0.8
Centro Reciclaje	CR4	37.9	2.09	8.88
Centro Reciclaje	CR5	84.8	2.08	1.17
Centro Reciclaje	CR6	30.6	2.14	0.75
Centro Reciclaje	CR7	107.6	2.39	0.71
Centro	CR8	20	1.85	1.74

Reciclaje				
Centro Reciclaje	CR9	182.5	2.38	0.83
Centro Reciclaje	CR10	133.3	2.49	0.73
Camino Opuntias	CaO1	55.7	2.68	0.57
Camino Opuntias	CaO2	38.1	2.43	0.85
Camino Opuntias	CaO3	20.2	1.86	0.72
Camino Opuntias	CaO4	36.1	4.55	0.29
Camino Opuntias	CaO5	43.7	2.39	0.57
Camino Opuntias	CaO6	20.1	3.9	0.3
Camino Opuntias	CaO8	280.1	2.32	0.81
Camino Opuntias	CaO9	438	2.13	1.17
Camino Opuntias	CaO10	199.8	2.33	0.8
Perimetral	Per1	27.1	1.96	3.64
Perimetral	Per2	170.7	2.05	1.65
Perimetral	Per3	9.6	2.04	7.63
Perimetral	Per4	339.8	2.47	0.86
Perimetral	Per5	244.8	2.25	0.91
Galapaguera	Gal1	47.6	2.09	2.09
Galapaguera	Gal3	26.2	1.7	1.75
Galapaguera	Gal4	21.2	2.75	0.55
Galapaguera	Gal5	15.4	1.94	0.85
Galapaguera	Gal6	75.1	3.06	0.45
Galapaguera	Gal7	113.4	1.99	1.62
Galapaguera	Gal8	170.8	2.5	0.67
Galapaguera	Gal9	118.7	2.31	0.7
Galapaguera	Gal10	74.2	2.64	0.57
Galapaguera	Gal11	190.3	2.13	2
Galapaguera	Gal12	255.6	2.42	0.76
Galapaguera	Gal13	18.7	2.36	1.18
Galapaguera	Gal14	-3	-2.99	0.07
Galapaguera	Gal15	17.6	5.26	0.2
Galapaguera	Gal16	67.7	2.69	0.63
Galapaguera	Gal17	71.3	1.8	0.44
Las Goteras	LGO1	25.4	2.01	0.98

Las Goteras	LGO2	442.9	2.35	0.98
Las Goteras	LGO3	209.5	2.38	0.83
Las Goteras	LGO4	50.2	2.41	0.82
Las Goteras	LGO5	79.2	2.32	0.66
Las Goteras	LGO6	164.7	2.37	0.92
Las Goteras	LGO7	301	2.48	0.84
Las Goteras	LGO8	359.7	2.26	1.03
Las Goteras	LGO9	144.3	2.25	0.77
Las Goteras	LGO11	6.1	1.41	0.5
Las Goteras	LGO12	8.4	1.84	1.02
Las Goteras	LGO15	26.5	1.25	0.86
Las Goteras	LGO16	37.9	2.01	0.79
Cerro Verde	CV1	69.6	2.51	0.66
Cerro Verde	CV2	35.1	2.47	1.02
Cerro Verde	CV3	24.9	2.6	0.78
Cerro Verde	CV4	25.1	2.65	0.69
Cerro Verde	CV5	20.7	2.78	0.63
Cerro Gato	CGa1	63.5	1.96	1.08
Cerro Gato	CGa2	20.9	2.47	0.95
Cerro Gato	CGa3	33.4	2.58	0.67
Cerro Gato	CGa4	23.3	2.43	1.03
Cerro Gato	CGa5	7.5	1.78	-0.5
Cerro Gato	CGa7	83.8	2.48	0.71
Cerro Gato	CGa9	27.4	2.31	1.06
Cerro Gato	CGa10	14.2	2.03	1.41
Cerro Gato	CGa11	35.6	2.57	0.6
Cerro Gato	CGa12	31.4	1.82	1.38
Cerro Gato	CGa13	28.9	2.45	0.85

Anexo 6: Foto gel acrilamida utilizando primer CIR05 para amplificar muestras de ADN de guayabillo de la Isla San Cristóbal, Galápagos

