

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites
específicos para mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth)**

Proyecto de Investigación

Andrea Daniela Argudo Rojas
Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 22 de Diciembre de 2017

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites específicos
para mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth),**

Andrea Daniela Argudo Rojas

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor:

Quito, 22 de Diciembre de 2017

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: Andrea Daniela Argudo Rojas

Código: 00111243

Cédula de Identidad: 1719983999

Lugar y fecha: Quito, 22 de Diciembre de 2017

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres y a mi hermana que me han apoyado a lo largo de la carrera universitaria y en cada paso de mi vida. Gracias por siempre creer en mí. Espero algún día compensarles por todo su cariño. ¡Este logro es suyo!

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer:

A Dios por darme la oportunidad de llegar a este momento tan especial en mi vida y por darme fortaleza para alcanzar cada uno de mis sueños.

A mis padres por toda la confianza, porque me han enseñado a no rendirme y me dan dado fuerzas para superar los obstáculos. Gracias por compartir conmigo mis alegrías, por toda su paciencia y entrega.

A mi ñaña por ser mi alegría tanto en momentos felices como difíciles. Eres la persona más importante en mi vida.

A María de Lourdes Torres por ser la directora de este proyecto, por confiar en mí, por las oportunidades brindadas y por toda su ayuda en la realización de este proyecto.

A Jennifer Rowntree (Manchester Metropolitan University) por su ayuda en el diseño de los marcadores microsátélites.

Al Chancellor Grant 2016 y el programa de Collaboration grants de la USFQ por financiar este proyecto.

A los miembros del comité: Bernardo Gutiérrez, María Mercedes Cobo y Gabriela Pozo por su valiosa guía y ayuda durante este proyecto. Gracias por responder todas mis dudas con alegría.

A Diego Vizcaíno, quien ha sido mi compañero desde el principio hasta el fin de la carrera. Gracias por tu apoyo incondicional, por los momentos y alegrías compartidas. Eres una bendición en mi vida.

A Carolina Armijos por haber sido mi compañera de estudio durante toda la carrera y a la vez una amiga incondicional.

A mis compañeros que me han apoyado en la elaboración de este proyecto y durante toda la carrera: Carlos Vintimilla, Juan Salazar, Jorge Álvarez, Rebeca Cortez, Diana Mollocana, María José Baquero y Bri Garzón. Gracias por todos los momentos de alegría juntos.

RESUMEN

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es un arbusto perenne que pertenece a la familia Ericaceae. Es una especie silvestre endémica de los Andes de Sudamérica que produce un fruto tipo baya carnosa entre 8 a 14 mm de diámetro, de color morado oscuro. Presenta varias propiedades etnobotánicas, ornamentales, medicinales y alimenticias para las comunidades ecuatorianas. El mortiño es clasificado como una especie en peligro de extinción debido a la fragmentación de su hábitat. Por esta razón, estudios de diversidad genética y estructura poblacional pueden aportar a la conservación de este importante recurso biológico. Los análisis genéticos de esta especie son limitados y además no se han desarrollado herramientas moleculares específicas para su estudio. Esta investigación tuvo como objetivo identificar, sintetizar, estandarizar y analizar el polimorfismo de 14 pares de marcadores microsatélites específicos para *V. floribundum*. Con estos pares de primers se lograron identificar 114 alelos (promedio de 8.14 alelos) en 60 muestras provenientes de 9 localidades de las provincias de Pichincha, Imbabura y Cotopaxi. Adicionalmente, se identificó una heterocigosidad esperada de 0.72 lo que demuestra una diversidad genética moderadamente alta. El análisis de variación molecular indicó que el 78.59% de la diversidad genética proviene de la variabilidad intrapoblacional y el 11.28% de la variabilidad interpoblacional. Esto también se puede observar en las distancias genéticas F_{st} , donde no se observó diferencias entre los individuos de las localidades analizadas a excepción de los individuos de Quilotoa. No se pudo identificar una estructura poblacional definida para la mayoría de muestras analizadas, sin embargo los individuos de Sigchos y Quilotoa tienden agruparse de forma independiente. Además, se observó que existe flujo genético entre todos los individuos de las localidades a excepción de Sigchos y Quilotoa, lo que puede ser explicado por diferentes factores ecológicos y geológicos. Sin embargo, para poder comprender de mejor manera la estructura poblacional del mortiño, es importante ampliar el muestreo a lo largo de toda la sierra ecuatoriana.

En este trabajo se reporta por primera vez marcadores microsatélites específicos para *V. floribundum*. Éstos pueden ser utilizados para determinar la diversidad genética y estructura poblacional de individuos de otras regiones de los Andes ecuatorianos, y así contribuir al manejo de esta importante especie nativa.

ABSTRACT

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) is a perennial shrub that belongs to the Ericaceae family. It is a wild species endemic to the Andes of South America that produces a fleshy, dark purple berry fruit between 8 to 14 mm in diameter. It presents several ethnobotanical, ornamental, medicinal and food properties for the Ecuadorian communities. Mortiño is classified as a species vulnerable to extinction due to the fragmentation of its habitat. For this reason, studies of genetic diversity and population structure can contribute to the conservation of this important biological resource. Genetic analyzes in this species are limited and no specific molecular tools have been developed for its study. This research aimed to identify, synthesize, standardize and analyze the polymorphism of 14 pairs of specific microsatellite markers for *V. floribundum*. With these pairs of primers, 114 alleles (average of 8.14 alleles) were identified in 60 samples from 9 locations in the provinces of Pichincha, Imbabura and Cotopaxi. Additionally, an expected heterozygosity of 0.72 was identified, which demonstrates a moderately high genetic diversity. Molecular variation analysis indicated that 78.59% of genetic diversity comes from intrapopulation variability and 11.28% from interpopulation variability. This can also be observed in the F_{st} genetic distances, where no differences were observed between the individuals of the analyzed locations except for the individuals of Quilotoa. It was not possible to identify a defined population structure for the majority of samples analyzed, however the individuals of Sigchos and Quilotoa tend to group independently. In addition, it was observed that there is genetic flow among all the individuals of the locations except for Sigchos and Quilotoa, which can be explained by different ecological and geological factors. However, in order to better understand the population structure of the mortiño, it is important to expand the sampling throughout the entire Ecuadorian highlands.

In this research, specific microsatellite markers for *V. floribundum* are reported for the first time. These can be used to determine the genetic diversity and population structure of individuals from other regions of the Ecuadorian Andes, and thus contribute to the management of this important native species.

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
TABLA DE CONTENIDO	8
ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1 Género <i>Vaccinium</i>	13
1.1.1 Taxonomía	13
1.1.2 Origen y distribución	13
1.1.3 Importancia económica.....	14
1.2 <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth, Mortiño	15
1.2.1 Generalidades	15
1.3 Diversidad genética	18
1.3.1 Marcadores moleculares	18
1.3.2 Microsatélites (Simple Sequence Repeat-SSRs):	19
1.3.3 Desarrollo y optimización de novedosos marcadores microsatélites específicos	20
1.3.3.1 Identificación de alelos: etiquetado de productos de PCR utilizando el método de los tres primers.	22
1.3.4 Estudios genéticos en el género <i>Vaccinium</i> mediante el uso de marcadores moleculares:.....	24
2. OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo General	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	25
4. JUSTIFICACIÓN	26
5. MATERIALES	27
5.1 Cuantificación de ADN de mortiño.....	27
5.2 Electroforesis en geles de agarosa	27
5.3 Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR	28
5.4 Armado de placas	28
5.5 Análisis de datos	28
6. MÉTODOS	29

6.1	Diseño de primers homólogos del mortíño	29
6.2	Obtención de muestras de mortíño	30
6.3	Preparación de muestras	30
6.5	Estandarización de primers homólogos de mortíño	30
6.6	Genotipado de marcadores microsatélites de mortíño	31
6.7	Análisis de datos	32
7.	RESULTADOS	33
7.1	Diseño de primers homólogos de mortíño	33
7.2	Estandarización de primers homólogos de mortíño	33
7.3	Genotipado y evaluación del desempeño de marcadores microsatélites de mortíño	33
7.4.	Análisis de datos	34
7.4.1.	Diversidad alélica del mortíño	34
7.4.2.	Diversidad genética del mortíño	35
7.4.3	Estructura poblacional	37
7.4.4	Análisis de parentesco	37
8.	DISCUSIÓN	38
8.1	Diseño de primers homólogos de mortíño	38
8.2	Estandarización de primers homólogos de mortíño	39
8.3	Genotipado y evaluación del desempeño de los marcadores microsatélites de mortíño	39
8.4	Análisis de datos	40
8.4.1	Diversidad alélica del mortíño	40
8.4.2	Diversidad genética del mortíño	41
8.4.3	Estructura poblacional	44
8.4.4	Análisis del nivel de parentesco y endogamia	46
9.	CONCLUSIONES	48
10.	RECOMENDACIONES	50
11.	BIBLIOGRAFÍA:	51
12.	TABLAS:	62
13.	FIGURAS:	66
13.	ANEXOS:	75

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: 30 marcadores microsatélites seleccionados de la lista de 357 marcadores generado por el diagrama de flujo descrito en Griffiths <i>et al.</i> , 2016 junto con su temperatura de annealing estandarizada.	62
Tabla 2: Resumen de la información proporcionada por 14 marcadores tipo microsatélites específicos para mortiño analizados en 60 muestras de mortiño procedentes de la sierra ecuatoriana	63
Tabla 3: Parámetro utilizados para analizar la diversidad genética de 60 individuos de mortiño para cada localidad con el uso de R studio.....	64
Tabla 4: Matriz de distancias genéticas de Weir y Cockerham (Fst) entre individuos de mortiño de las 9 localidades.....	64
Tabla 5: Valores p para evidenciar cuellos de botellas mediante el software Bottleneck para cada una de las localidades.....	65
Tabla 6: Coeficientes de coancestry calculados mediante el método de Wang para los 60 individuos mediante el software <i>Coancestry</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa del Ecuador donde se observa los sitios de colección de muestras recolectadas por Cobo, 2014.....	66
Figura 2: Amplificación y genotipado de muestra C008 con el primer 11 y 13. A. Gel de agarosa (1.5%) para evidenciar la amplificación de la muestra C008 con el primer 11 y 13. B. Genotipado en el software GeneMarker de primer 11 marcado con VIC y primer 13 marcado con NED.....	67
Figura 3: Análisis de variación molecular (AMOVA) intrapoblacional, interpoblacional y entre regiones.....	68
Figura 4: Gráfico de <i>Fst</i> para las 9 localidades de mortiño analizadas.....	69
Figura 5: Dendrograma obtenido por metodo Neighbor Joining de las 9 localidades analizadas.....	70
Figura 6: Dendrograma obtenido por método Neighbor Joining de los 60 individuos analizados.....	71
Figura 7: Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido de las 60 muestras analizadas.....	72
Figura 8: Red de migración entre las 9 localidades estudiadas. Filter Threshold 0.6 Nm.....	73
Figura 9: Red de migración entre las 9 localidades estudiadas sobre mapa geográfico. Mapa obtenido de Cobo <i>et al.</i> , 2016.....	74
Figura 10: Gráfico de estructura poblacional del mortiño (<i>Vaccinium floribundum</i> Kunth) utilizando un k óptimo de 7.....	74

ANEXOS

Anexo 1: 60 Muestras utilizadas para la estandarización y genotipado de marcadores tipo microsatélites seleccionados homólogos para mortíño.....75

1. Introducción

1.1 Género *Vaccinium*

1.1.1 Taxonomía

La taxonomía del género *Vaccinium* es muy compleja debido a la gran cantidad de especies. En 1941, Sleumer dividió este género en 33 secciones dependiendo de su morfología. Para realizar la clasificación morfológica se han utilizado diferentes caracteres como frutos, semillas y partes vegetativas. Sin embargo, estos indicadores tradicionales utilizados para delimitar el género, fallan al momento de distinguir entre taxones (Kron *et al.*, 2002). Adicionalmente, la falta de conocimiento de muchas especies nativas de este género dificulta aún más la división taxonómica.

Sin embargo, mediante estudios moleculares se ha logrado dividir a *Vaccinium* en 2 subgéneros y diferentes secciones dentro de éstos. Subgénero *Oxycoccus*: sección *Oxycoccus* y *Oxycoccoides*. Subgénero *Vaccinium*: sección *Batodendron*, *Brachyceratium*, *Bracteata*, *Ciliata*, *Cinctoandra*, *Conchophyllum*, *Cyanococcus*, *Eococcus*, *Epigynium*, *Galeopetalum*, *Hemimyrtillus*, *Koreanum*, *Myrtillus*, *Neurodesia*, *Oarianthe*, *Oreades*, *Pachyanthum*, *Polycodium*, *Pyxothamnus*, *Vaccinium*, y *Vitis-idaea* (Kron *et al.*, 2002).

1.1.2 Origen y distribución

El género *Vaccinium* es considerado como uno de los más grandes dentro de la familia Ericaceae, subfamilia Vaccinioideae, debido a que abarca alrededor de 450 especies. Es un género cosmopolita ya que se han encontrado especies localizadas en zonas tropicales de Asia y África. Sin embargo, su mayor distribución se encuentra en el hemisferio Norte (Guirado *et al.*, 2008).

Dentro de este género se encuentran especies de gran importancia comercial como son: *Vaccinium. corymbosum* (arándano azul-blueberry), *Vaccinium. macrocarpon* (arándano-cranberry), *Vaccinium. vitis-idaea* (arándano rojo-lingonberry), y *Vaccinium myrtillus* (bilberry, whortleberry) (Song y Hancock, 2012). Los cultivos de arándano azul-blueberry, arándano-cranberry y arándano rojo-lingonberry fueron domesticados en el siglo XX.

El arándano azul-blueberry es considerado el fruto de mayor importancia a nivel comercial debido al aumento de su producción a nivel mundial (58 601 hectáreas en 2007) (Lehert, 2008).

Dentro del género *Vaccinium* se encuentran especies que pueden crecer en distintas condiciones ambientales. Algunas especies se extienden en zonas tropicales montañosas y zonas de bajas latitudes con climas fríos y templados. Por otro lado, en Norteamérica existen especies que pueden crecer en áreas húmedas y secas. Además, es un género que puede tolerar condiciones ácidas en cualquier tipo de entorno (Bailey *et al.*, 1997).

Las especies dentro del género *Vaccinium* han sido una gran fuente de alimento para la fauna silvestre en Norteamérica ya que representa entre el 2 y el 5% de la dieta para 57 especies de aves y mamíferos (Courteau, 2012). Por otro lado, estas especies tiene una gran cantidad de vitamina C y K, por lo que son consumidas en jugos, jaleas, mermeladas dentro de la dieta alimenticia del ser humano (Courteau, 2012).

1.1.3 Importancia económica

Este género se caracteriza por tener un fruto tipo baya con altas cantidades de pectina, celulosa, antocianinas y vitamina C (Trujillo, 2008). Varios de estos compuestos presentan propiedades medicinales: antioxidantes, antiulcerales,

antiinflamatorias y antitumorales. Por ejemplo, las hojas y frutos de la especie lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades reumáticas e infecciones de la vejiga (Debnath, 2006). El arándano rojo-cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) es muy utilizado para combatir infecciones urinarias debido a que interfiere en la adhesión fimbrial bacteriana en el tracto urinario (Schmidt y Sobota, 1984).

Debido a estas propiedades, el cultivo comercial de estas especies ha aumentado considerablemente. En cuanto al arándano azul-blueberry, la producción aumentó en el año 2010 a 312 047 toneladas cosechadas en 74 649 hectáreas en todo el mundo, siendo Estados Unidos el mayor productor con el 60% de la producción, Canadá con el 27%, seguido por Polonia y Alemania. Por otro lado, el cultivo de arándano rojo-cranberry aumentó de igual manera en el año 2010 a 394 606 toneladas cosechadas en 22 444 hectáreas a nivel mundial en donde Estados Unidos contribuye con el 78%, Canadá con el 19%, seguido por Belarus, Azerbaijan y Latvia (USDA, 2012).

En la región andina de Sudamérica no se han domesticado las especies para la producción comercial, por lo que solo existe cosecha de plantas silvestres para aprovechar sus propiedades medicinales (Courteau, 2012). Dentro de esta región existen especies nativas como el mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth), el cual es muy utilizado dentro de la gastronomía ecuatoriana.

1.2 *Vaccinium floribundum* Kunth, Mortiño

1.2.1 Generalidades

Según datos del Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador están registradas tres especies de mortiño: *Vaccinium distichum*, *Vaccinium crenatum* y

Vaccinium floribundum, siendo *V. floribundum* la especie de mortiño más común (Coba *et al.*, 2012). Sin embargo, el registro del Herbario Nacional del Ecuador registra la existencia de otra especie de mortiño *V. saxatilis*.

El mortiño, también conocido como uva de monte, agraz o macha macha, es un arbusto pequeño que crece de manera silvestre en zonas montañosas húmedas como los páramos (Loján, 2003). Esta especie se distribuye en Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela, principalmente en las zonas andinas entre 1 400 y 4 350 msnm, en climas templados y fríos entre 8 y 16° C (Coba *et al.*, 2012; Trujillo, 2008). En la actualidad, debido a la extensión de las zonas agrícolas, existe un desplazamiento de territorio del mortiño, provocando que éste se encuentre a mayores altitudes (3 500 hasta 4 350 msnm) (MAGAP, 1988).

Se considera como una especie predominante de los páramos andinos. En el Ecuador, esta especie crece desde la provincia del Carchi hasta la provincia de Loja, incluyendo provincias de la sierra como: Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Cañar y Azuay (Coba *et al.*, 2012). Según colectas realizadas, las especies de *Vaccinium distichum* y *Vaccinium crenatum* se distribuyen también en las provincias de Azuay y Loja (Luteyn, 2002).

El mortiño es un arbusto que puede crecer hasta 3.5 metros de altura, pero se pueden encontrar también especímenes enanos y postrados. Su flor es de color rosado o blanco y tiene un follaje verde oscuro. Su reproducción es de forma vegetativa (rizomas) y sexual por medio de la autopolinización (Luteyn, 2002). Presenta frutos en forma de bayas de 8 mm a 1 cm de diámetro, de color azul-morado hasta casi negro al madurar, los cuales crecen en racimos de 3.5 a 5 cm de largo y tienen sabor dulce o astringente (Escobar, 2009).

El mortiño florece dos veces al año; la primera floración ocurre de febrero a mayo y la segunda de agosto a noviembre. Por otro lado, la fructificación es de abril a junio y de septiembre a diciembre (Escobar, 2009).

Esta especie presenta varias características importantes para el medio ambiente, la fauna silvestre y las comunidades andinas. En cuanto al medio ambiente, es muy importante debido a que presenta la capacidad de regeneración del suelo a partir de las raíces en lugares quemados, por lo que se emplea para la reforestación de los páramos (Aguilar, 2009). Adicionalmente, el mortiño es una fuente de alimento para la fauna silvestre como: ardillas, tórtolas, mirlos, pavos, palomas, tucanes, etc. Estos animales a su vez aportan dispersando las semillas de la especie (Escobar, 2009). Por otro lado, el mortiño es un arbusto utilizado para fines ornamentales por poseer hojas brillantes y de color granate que pueden ser podados con formas decorativas (Noboa, 2010; Trujillo, 2008). Además, puede ser utilizado como tinte debido a su color duradero (Coba *et al.*, 2012).

El mortiño es consumido por los ecuatorianos, quienes le han dado usos gastronómicos y medicinales. En cuanto a usos gastronómicos, el mortiño es el ingrediente clave para la elaboración de la tradicional de colada morada el día de los difuntos (Estrella, 1986). Además, comunidades andinas, han utilizado el mortiño para la elaboración de jugos, mermeladas, pasteles, vinos y helados. En cuanto a los usos medicinales, el mortiño presenta antocianinas, proantocianinas y compuestos fenólicos antioxidantes, que brindan propiedades antiinflamatorias, prevención de la acumulación de lípidos e inhibición de la adipogénesis (Schreckinger *et al.*, 2010). Por esta razón, las comunidades andinas utilizan a esta especie para aliviar el reumatismo, fiebre, cólicos, gripe, borrachera, dolencias de los riñones, pulmones e hígado (CESA, 1993).

1.3 Diversidad genética

La diversidad genética se define como cualquier medida que cuantifique la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población (Hughes *et al.*, 2008). La variación genética es una de los tres niveles de la biodiversidad recomendado para la conservación según IUCN (World Conservation Union) (Mc Neely *et al.*, 1990). La diversidad genética está relacionada con la variedad de alelos y genotipos en una población determinada o estudiada (Cobo, 2014).

Este término es muy importante debido a que tal variación es requerida para que las poblaciones puedan responder y adaptarse frente a cambios ambientales. Además, es una herramienta para reducir la depresión endogámica y colonizar nuevos nichos ecológicos. Cuando existe una diversidad genética baja, las probabilidades de supervivencia de una especie disminuyen ya que no presentan características que puedan ser escogidas por selección natural para poder sobrevivir (Frankham *et al.*, 2002).

Dentro de la selección asistida, la diversidad genética es muy importante debido a que permite conocer las variaciones genotípicas relacionadas con las características fenotípicas de interés alimenticio, fitoquímico y ornamental que varían dentro de una especie (Cobo, 2014).

1.3.1 Marcadores moleculares

Para estudios de diversidad genética es muy importante el uso de marcadores moleculares. Éstos revelan el nivel de polimorfismo que presenta una población (Giffiths *et al.*, 2000). Un marcador molecular es un segmento de ADN o un locus polimórfico que permite conocer el genotipo del organismo que presenta el marcador o los loci ligados a éste (Srivastava *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares fueron descubiertos en 1980 y desde entonces se desarrollan nuevos tipos constantemente. Las características que debe tener un marcador ideal son: ser polimórfico, multi-alélico, codominante, no epistático, neutro, insensible al ambiente, abundante y distribuido en el genoma. De esta manera, se logra estimar la estructura genética de las poblaciones (Lorz y Wenzel, 2005).

Existen dos tipos de marcadores moleculares: 1) aquellos basados en la hibridación de ADN, y 2) aquellos basados en la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR (Varshney *et al.*, 2005).

1.3.2 Microsatélites (Simple Sequence Repeat-SSRs):

Los microsatélites (SSRs) son secuencias de ADN cortas entre 1 a 6 pb que se repiten en tándem (*tandem repeats*-TRs) (Guichoux *et al.*, 2011). Los TRs son de relevancia evolutiva debido a su inestabilidad ya que mutan entre tasas de 10^3 y 10^6 (Vierira *et al.*, 2016). Además, se encuentran distribuidos a lo largo del genoma de organismos eucariotas y procariotas (Pérez *et al.*, 2013). El número de repeticiones en tándems en un locus puede variar significativamente, lo que convierte a los microsatélites en el marcador molecular más informativo.

El nivel de polimorfismo se puede analizar justamente por la adición o eliminación de unidades que se repiten conocidas como “motivos”. Esta variación en el número de repeticiones generan distintos tamaños de fragmentos que varían de generación en generación a causa del deslizamiento de la polimerasa durante la replicación de ADN o por errores en la recombinación (Viera *et al.*, 2016).

Los microsatélites presentan varias ventajas como: ser muy polimórficos, detectar un número elevado de locus, presentar una herencia mendeliana codominante, interpretación de resultados sencilla, reproducibilidad elevada, transferencia de

resultados entre laboratorios y automatización (Vignal *et al.*, 2016; Griffiths *et al.*, 2016).

Los microsatélites son muy utilizados para estudios de diversidad genética y relaciones filogenéticas (Varshnet *et al.*, 2005). Son una herramienta para conocer la estructura genética de poblaciones y subpoblaciones. Se los utiliza para conocer el flujo genético y cuellos de botella, por lo que permite conocer la historia genética de la flora y fauna de las poblaciones (Cobo, 2014).

1.3.3 Desarrollo y optimización de novedosos marcadores microsatélites específicos

Los avances en la secuenciación de ADN ha tenido un gran impacto en los estudios de ecología, evolución y genética de poblaciones (Castoe *et al.*, 2012). Dentro de estos avances se encuentra el desarrollo de marcadores moleculares como los SSRs, importantes para estudiar la genética de poblaciones. Anteriormente, se desarrollaban SSRs mediante bibliotecas genómicas, clonación, hibridación para detección de clones positivas, aislamiento de plásmidos y secuenciamiento Sanger (Castoe *et al.*, 2012). Estas técnicas eran costosas y se obtenía una baja cantidad de loci. Sin embargo, el secuenciamiento de segunda generación ha disminuido los costos para obtener SSRs de manera más eficiente para realizar análisis genéticos y poblacionales.

Diferentes trabajos han desarrollado distintas técnicas y software para identificar loci SSR a partir de lecturas secuenciadas. Estos software identifican las regiones microsatélites y sus zonas flanqueantes para el desarrollo de primers o cebadores.

Para la obtención de las lecturas de secuenciación se han utilizado distintas tecnologías como es el secuenciamiento 454, en donde se utilizan cápsulas de oro para adherir los fragmentos a secuenciar. No obstante, este tipo de secuenciación, involucra

un aumentó en los costos de producción por el paso de encapsulamiento. (Castoe *et al.*, 2012).

Sin embargo, en la actualidad se utiliza un análogo del secuenciamiento 454 conocido como secuenciamiento *Illumina* (sequence *Illumina* MiSeq) debido a los bajos costos.. La plataforma de *Illumina* lee secuencias más largas de ambos extremos, generando un mayor número de microsatélites. Tras la generación de largas secuencias, es necesario limpiar las terminaciones utilizando la plataforma de *Quality filtering of data*. Adicionalmente, se debe analizar estadísticamente la calidad de las secuencias utilizando *FastQC v 0.11.4* (Griffiths *et al.*, 2016).

Los archivos que proceden de *Trimmomatic* son utilizados para identificar los microsatélites y diseñar los primers. Las secuencias que contengan repeticiones en tándem de 1 a 6 pb son identificados utilizando el programa *Pal_finder v.0.02.04*. Además, este programa identifica las zonas flanqueantes, las cuales son zonas ideales para el desarrollo de primers específicos. El resultado de esta plataforma es un lista con todos los microsatélites identificados, incluyendo los motivos, secuencia de los primers y el número de ocurrencia de cada motivo (Griffiths *et al.*, 2016).

Sin embargo, es importante eliminar microsatélites cuyos primers no pueden ser diseñados en primer3 (si las zonas flaqueantes son muy cortas o si presentan secuencias de pares de bases sin las características deseadas como temperatura de *annealing* o contenido de CG), locus imperfectos con motivos interrumpidos, y locus con secuencias de primers que se repitan en más de una vez en la secuencia total. Para ello, se utiliza el programa *Pal_filter*. Finalmente, se utiliza el programa *PANDAseq* para confirmar que las secuencias de los primers ocurran en la misma región de ADN, incrementando el éxito de amplificación (Griffiths *et al.*, 2016). A partir de esto se genera una matriz

donde se enlistan todos los microsatélites SSRs reconocidos con sus respectivos primers. Según Guichoux *et al.*, 2011, se deben elegir primers que amplifiquen las regiones microsatélites con más de dos pares de bases por motivo. Esto se debe a que se evita el problema “*slutter*” generado por el deslizamiento de la Taq polimerasa durante el proceso de amplificación cuando se tiene motivos de dos pares de bases.

1.3.3.1 Identificación de alelos: etiquetado de productos de PCR utilizando el método de los tres primers.

Anteriormente, para identificar y analizar microsatélites SSRs, se utilizaban métodos como isótopos radiactivos o mediante tinción de geles de acrilamida con plata. Sin embargo, el genotipado con fluorescencia ha revolucionado el análisis de marcadores moleculares en la última década (Guirardo *et al.*, 2008). Este método consiste en marcar con fluoróforos (VIC, FAM, NED, PET) a los amplicones o productos de PCR en el extremo 5' durante el proceso de PCR. En algunos estudios previos, se utilizaban primers específicos marcados con un fluoróforo diferente, sin embargo, la síntesis de cada primer específico junto con un fluoróforo puede ser costoso, y más aún cuando se desea estudiar entre 8 a 15 marcadores microsatélites (Blacket *et al.*, 2012). Por esta razón, se ha desarrollado un protocolo conocido como sistema de tres primers donde se utiliza un primer universal marcado con un fluoróforo específico. Se han desarrollado cuatro posibilidades de primers universales conocidos como “Tail A, B, C y D”. La Tail A y B son utilizados comúnmente como adaptadores en protocolos de secuenciación de ADN 454. (454 DNA sequencing) (Margulies *et al.*, 2005). Mientras que la Tail C y D fueron diseñados por Blacket *et al.*, 2012. Cada uno de los primers universales fue caracterizado según el tamaño, contenido de CG y temperatura de melting. Según estos criterios, se debe escoger un primer universal con el mayor contenido de CG y temperatura de annealing (Tail A), de esta manera se evita

inespecificidades por la hibridación del primer en lugares inespecíficos del genoma de la especie a analizar.

El sistema de tres primers consiste en la utilización de un primer forward específico sintetizado con la secuencia de la cola universal (*Tail A*) utilizado en el extremo 5', un primer específico reverse y la cola universal (*Tail A*) marcada con un fluoróforo (FAM, VIC, PET, NED). El etiquetado de los fragmentos de PCR comienza en las primeras etapas de termociclado donde el primer forward y reverse generan fragmentos complementarios de la cola universal junto con la amplificación del producto deseado. De esta manera, en las siguientes etapas, la cola universal marcada con fluoróforo es capaz de adherirse a la secuencia complementaria generada por la cola del primer forward en el producto de PCR y marcarlo con el fluoróforo (Blacket *et al*, 2012).

La detección de fluorescencia se basa en la separación de los amplicones marcados mediante electroforesis capilar. Durante este procedimiento, se separan los fragmentos por tamaño. Adicionalmente, se dispara un rayo láser que causa la fluorescencia del fluoróforo. La señal es separada por un sistema de difracción y es detectado por una cámara CCD (Life Technologies, 2014).

Este sistema ha reducido significativamente los costos debido a que no es necesario marcar cada primer específico con fluoróforo. Adicionalmente, ha mejorado eficientemente el genotipado por la precisión al momento de identificar alelos (Blacket *et al*, 2012).

1.3.4 Estudios genéticos en el género *Vaccinium* mediante el uso de marcadores moleculares:

Dentro de género *Vaccinium* se ha utilizado herramientas como los marcadores moleculares para realizar estudios genéticos en especies cultivadas y silvestres. Mediante estos estudios, se han desarrollado varias técnicas para la selección asistida y optimización en el fitomejoramiento (Gupta y Varshney, 2000).

Se han utilizado marcadores como RFLP, RAPD, SSR e isoenzimas para realizar estudios genéticos en arándano azul-blueberry (Boches *et al.*, 2006). De igual manera, se ha realizado estudios de diversidad utilizando isoenzimas en arándano rojo-cranberry (Bruederle *et al.*, 1996). En cuanto al mortiño, se han realizado estudios genéticos utilizando primers heterólogos de arándano azul-blueberry , generados a partir de bibliotecas EST y genómicas, en diferentes localidades de las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura (Cobo, 2014).

En este estudio, se pretende diseñar y estandarizar un protocolo de amplificación para un set de 14 primers polimórficos específicos para mortiño a partir del secuenciamiento de Illumina next-generation y el uso de primers universales marcados con fluoróforos. Estos primers podrán ser utilizados para estudios de diversidad genética y estructura poblacional en una mayor cantidad de provincias a lo largo de la sierra ecuatoriana.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Diseñar, estandarizar y validar nuevos marcadores microsatélites SSRs específicos para mortiño (*V. floribundum* Kunth) obtenidos a partir de la secuenciación y análisis del genoma de la especie.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Seleccionar y sintetizar 30 marcadores genéticos específicos para *V. floribundum* a partir del repertorio de microsatélites generados mediante la secuencia del genoma de mortiño.
- b) Estandarizar un protocolo de amplificación para los marcadores seleccionados y evaluar la calidad de amplificación.
- c) Seleccionar y evaluar el polimorfismo de los marcadores microsatélites SSRs estandarizados para utilizarlos en futuros estudios de diversidad genética.
- d) Realizar un análisis de diversidad genética preliminar y estructura poblacional para validar la funcionalidad de los marcadores microsatélites diseñados.

3. Área de estudio

Para realizar este estudio se utilizaron muestras de ADN extraídas a partir de hojas de mortiño recolectadas de 9 localidades (San Pablo, Cotacachi-Cayapas, Cashaloma, Mojanda, Parque Nacional Cotopaxi norte, Parque Nacional Cotopaxi sur, Ilinizas, Sigchos y Quilotoa) de las provincias de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. Estas muestras fueron recolectadas, extraídas y

utilizadas en el estudio realizado por (Cobo, 2014) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito (Figura 1).

4. Justificación

Ecuador es un país, con una gran cantidad de diversidad agrícola. A lo largo del tiempo, las comunidades locales se han encargado de domesticar numerosas especies nativas, las cuales se caracterizan por tener propiedades nutricionales y medicinales (Bussmann, 2010). Estas especies presentan distintas cualidades que pueden brindar ventajas adaptativas frente al problema del cambio climático, para de esa manera ampliar la producción de alimentos y abastecer la demanda alimenticia. Muchas investigaciones tienen como objetivo potenciar la utilización de la biodiversidad agrícola del país para aumentar la calidad nutricional, mejorar la dieta ecuatoriana y proteger la seguridad alimentaria nacional (Lewis *et al.*, 1991).

Sin embargo, muchas especies nativas de valor agrícola, como el mortiño, son vulnerables a la extinción por la fragmentación de sus hábitats naturales y por la siembra de cultivos tradicionales (Cobo et al., 2016). Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones sobre ecología y biología, las cuales nos brindarán el conocimiento necesario para establecer estrategias de conservación y promover una agricultura sostenible. Los estudios de diversidad genética permiten conocer el estado poblacional de estas especies de interés y de esta manera promover programas de conservación de estos recursos biológicos. En base a estos estudios, se pueden desarrollar colecciones de germoplasma que pueden ser útiles para el mejoramiento genético y la conservación de especies vegetales (Mosquera, 2015).

Hasta el momento, se ha realizado un estudio preliminar de la diversidad genética del mortiño utilizando primers heterólogos desarrollados para arándano azul-

blueberry (Cobo et al., 2016). La utilización de primers no específicos puede que ser que no capte la diversidad genética real de la especie y por lo tanto no se la pueda analizar debidamente.

Por esta razón, el desarrollo y estandarización de herramientas moleculares específicas para el mortiño, ayudará a realizar estudios de diversidad genética más confiables. De esta manera, se podrá conocer la estructura poblacional y composición genética del mortiño para el desarrollo de estrategias de conservación y programas de agricultura sostenible.

5. Materiales

5.1 Cuantificación de ADN de mortiño

- Nanodrop 1000 (ThermoScientific)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

5.2 Electroforesis en geles de agarosa

- UltraPure™ Agarose (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris-base-Ácido Bórico-EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL (Labnet International)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

5.3 Amplificación de regiones microsatélites SSR mediante PCR

- 14 pares de primers SSR específicos para mortiño (Tabla 1).
- Taq DNA polimerasa 5U/ μ l (Invitrogen).
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/ μ l (Invitrogen).
- Buffer PCR 10X (Invitrogen).
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen).
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).
- dNTP's 10 mM (Invitrogen).
- Cola universal A (5'GCTCCCTCGCCCA) marcada con distintos fluoróforos. (FAM, NED, PET, VIC) (Invitrogen).
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).
- T100 Thermocycler (BIORAD).

5.4 Armado de placas

- MicroAmp® Optima 96-well Reaction Plate (Invitrogen).
- MicroAmp® 8-Cap Strip (Invitrogen).

5.5 Análisis de datos

- Genemapper v.3.0.
- Software R.
- Software STRUCTURE.
- Software *Coancestry*.
- Software *Bottleneck*

6. Métodos

6.1 Diseño de primers homólogos del mortño

Gracias a la colaboración con Jennifer Rowntree, Manchester Metropolitan University, un individuo *V. floribundum* proveniente de la provincia de Imbabura, localidad Cashaloma, fue secuenciado mediante la utilización de una plataforma de secuenciación profunda bidireccional (pair-end sequencing) MiSeq (Illumina, San Diego, California). Las lecturas fueron filtradas por el programa *Trimmomatic* y recortadas utilizando la función *sliding window* con *threshold* de 20. Luego de realizar el filtrado correspondiente, se obtuvieron 2 x 1`680,936 lecturas. Después, los loci microsatélite y sus regiones flanqueantes fueron identificados mediante el programa *PAL_finder v.0.02*. En este programa se realizó el diseño de los primers en base a las recomendaciones del proctolo del kit *Type-it Microsatellite PCR kit* (Qiagen, Germany), que incluía pares de bases óptimas entre 20-30 pb, 40-60% de contenido de CG, temperatura de *melting* (*Tm*) óptima de 62 °C, con un rango entre 59 °C y 65 °C, y una diferencia máxima de *Tm* de 3 °C entre primer *forward* y *reverse*. *PAL_finder v.0.02* fue configurado para buscar como mínimo 8 unidades repetidas en cada locus microsatélite, variando entre motivos de dos a seis nucleótidos.

De la lista generada de loci microsatélites se seleccionaron 30 marcadores con motivos de 3 o más nucleótidos. Se sintetizaron sets de primers para estos 30 loci, para los cuales los primers *forward* incluyeron la secuencia denominada Cola A (Tail A) propuesta por Blacket *et al.*, 2012, para lograr incorporar el flouróforo durante el proceso de amplificación mediante PCR.

6.2 Obtención de muestras de mortíño

Se utilizaron 60 de las 129 muestras las muestras de mortíño recolectadas en el estudio de Cobo (2014), distribuidas en 9 localidades de las provincias de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi en la Sierra norte ecuatoriana. Las 9 localidades se agruparon entre 3 distintas regiones propuestas por Cobo *et al.* (2016). En este mismo estudio, se extrajo ADN utilizando buffer CTAB de acuerdo al protocolo descrito por Shagai *et al.* (1984). Alicuotas de estas extracciones fueron utilizadas directamente para el presente estudio.

La selección de las 60 muestras de ADN se basó en el valor de heterocigosidad observada (H_o) reportada para cada localidad en Cobo *et al.* (2016). Para las localidades con valores de H_o entre 0.32 y 0.50, se seleccionaron entre 5-10 muestras, mientras que para la localidad de Quilotoa con valor de H_o de 0.09, se seleccionaron 3 muestras. La selección de estas muestras se encuentra descrita en Anexo 1.

6.3 Preparación de muestras

Las 60 muestras seleccionadas fueron cuantificadas mediante espectrofotometría en un Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) y posteriormente diluidas a una concentración de 20 ng/ μ l.

6.5 Estandarización de primers homólogos de mortíño

Se realizaron pruebas de amplificación mediante PCR con pocas muestras de ADN (3) del Anexo 1, utilizando los 30 pares de primers SSR (microsatélites) descritos en la sección 6.1. Las reacciones y condiciones de ciclado de PCR utilizadas fueron descritas en Schuelke (2000). En cada reacción se utilizó un volumen total de 10 μ l que contenían 20 ng de ADN, Buffer de PCR 1X (Invitrogen, California, USA), 2 mM

MgCl₂ (Invitrogen, California, USA), 0.2 µM de dNTPs, 0.2 mM de cada primer y una unidad de Taq polimerasa (Invitrogen, California, USA). Se amplificó el ADN en 30 ciclos, utilizando un termociclador T100 (BioRad, California, USA) programado para 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 1 minuto y 30 segundos de *annealing* a 60°C y 1 minuto de extensión final a 72°C.

Para comprobar la amplificación de los marcadores, se realizó una electroforesis en geles de agarosa 1.5% y se colocó 5 µl de producto de PCR junto con 2 µl de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 1 µl de ladder 100 pb en el pocillo correspondiente. Se corrió el gel por 1 hora a 80 voltios.

6.6 Genotipado de marcadores microsatélites de mortiño

Los primers con amplificación exitosa se utilizaron para analizar las 60 muestras de mortiño seleccionadas (Anexo 1).

Para estas amplificaciones se realizaron reacciones en volúmenes de 30 µl, compuestas por 20 ng de ADN, Buffer de PCR (1X) (Invitrogen, California, USA), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen, California, USA) 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen, California, USA) 0.5 mM de primer reverse y cola universal A (Tail A) marcada con fluoróforo (VIC, FAM, NED, PET), 0.15 mM de primer forward y 1 unidad de Taq polimerasa Platinum (Invitrogen, California, USA). Se utilizó el mismo programa de termociclado descrito en la sección 6.2. Se realizó una electroforesis en geles de agarosa 1.5% y se corrió durante 1 hora a 80 voltios.

Las muestras fueron enviadas a MACROGEN INC. (Seúl, Corea), en donde se analizaron mediante electroforesis capilar utilizando el equipo ABI 3730XL (Applied Biosystems, California, USA).

6.7 Análisis de datos

Mediante el programa *Genemapper v 3.0*, se lograron observar los alelos detectados por electroforesis capilar. Se generó una matriz codominante que contenía los alelos en pares de bases por cada locus (Columnas: nombre de loci; Fila: individuos). Mediante el uso del programa R (R Core Development Team, 2013) se realizaron análisis de diversidad genética por locus y por población (número de alelos, heterocigosidad esperada (H_e), heterocigosidad observada (H_o), información provista por cada locus (polymorphic information content (PIC)) y flujo genético. Se evaluaron varios parámetros de la estructura poblacional de la muestra mediante la estimación de distancias genéticas de Weir y Cockerham F_{st} (Weir y Cockerham, 1984), análisis de varianza molecular (AMOVA), análisis de componentes principales (PCoA) y la generación de un dendrograma mediante el método Neighbor Joining (Felsenstein y Kuhner, 1994). Adicionalmente, se construyó una red de migración de acuerdo a Sundqvist *et al.*, 2013.

Se utilizó el software Bottleneck *v 1.2.02* (Cornet y Luikart, 1999) para calcular las probabilidades de los cuellos de botella en las poblaciones de mortiño.

Adicionalmente, se realizó evaluó la estructura poblacional de la muestra utilizando inferencia bayesiana en el programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Se corrió el programa con datos preliminares, evaluando el número de posibles linajes que mejor explican los datos (K) entre K=1 y K=10, por 15 iteraciones por un número de 100 000 pasos de burn-in y 100 000 pasos de MCMC (Markov Chain Monte Carlo). Para estimar el valor de K óptimo se utilizó la versión online de Structure Harvester ([http://tayloro.biologyucla.edu/ Struct_harvest](http://tayloro.biologyucla.edu/Struct_harvest)) (Evanno *et al.*, 2005) que establece el valor óptimo mediante el valor de deltaK (ΔK).

Para analizar el nivel de parentesco y endogamia entre los individuos se utilizó el programa *Coancestry* (Wang, 2011). Los coeficientes de coancestro (θ_{xy}) para cada localidad fueron estimados mediante índices de Wang (Wang, 2011).

7. Resultados

7.1 Diseño de primers homólogos de mortiño

Se logró identificar 357 loci microsatélite con sus respectivas regiones flanqueantes con el programa *PAL_finder v.0.02*. Dentro de este grupo de loci, se identificaron motivos de 1 hexa-, 1 penta-, 1 tetra-, 21 tri y 333 di-nucleótidos. A partir de esta lista, se seleccionaron 30 marcadores microsatélites SSR basados en el número de nucleótidos (entre 3-6 pb), con primers con T_m entre 58 °C a 63 °C y una longitud de primers entre 18 a 25 pb (Tabla 1).

7.2 Estandarización de primers homólogos de mortiño

Se probó los 30 pares de primers homólogos seleccionados para mortiño. De estos 30 primers, únicamente se logró una amplificación exitosa con 26 pares de primers. De los cuatro pares de primers restantes, el primer M003 no amplificó y los primers M017, M022 y M028 presentaron inespecificidades.

7.3 Genotipado y evaluación del desempeño de marcadores microsatélites de mortiño

Las 60 muestras de mortiño analizadas fueron genotipadas utilizando 14 marcadores microsatélites SSR. Se eligieron 14 marcadores de los 26 porque mostraron una amplificación exitosa, mayor capacidad de incorporar el fluoróforo y fueron polimórficos. Los 12 primers restantes no fueron seleccionados porque presentaron

complicaciones al momento de incorporar el fluoróforo. En la Figura 2 se observa la comparación entre el primer 13 marcado con NED y el primer 11 marcado con VIC, donde se evidencia la diferencia entre la amplificación y el genotipado con la muestra C008. Pese a que el primer 13 mostró amplificación, no se observaron alelos en el genotipado. Sin embargo, el primer 11 si muestra una amplificación y genotipado satisfactorio.

Se evaluó el desempeño informativo de los microsatélites mediante el análisis del número de alelos (N_a), heterocigosidad esperada (H_e), observada (H_o) y PIC por locus. Se encontró un total de 114 alelos en un rango de 3-14 alelos por locus (en promedio, 8.14 alelos por locus) (Tabla 2). El primer M021 resultó ser el más informativo con 14 alelos encontrados, mientras que los menos informativos fueron los M002, M007, M009 con 3 alelos cada uno. Por otro lado, los valores de PIC se encontraron entre 0.36 y 0.86. Los 14 marcadores microsatélites mostraron ser polimórficos e informativos.

7.4. Análisis de datos

7.4.1. Diversidad alélica del mortuño

Se evaluó el número de alelos y alelos privados encontrados por localidad (Tabla 3), siendo el Parque Nacional Cotopaxi Norte e Ilinizas, las localidades con mayor cantidad de alelos (57), de los cuales 6 y 11 fueron alelos exclusivos respectivamente. Los individuos de las localidades de San Pablo, Cashaloma, Cotacachi-Cayapas, Mojanda, P.N. Cotopaxi-Sur y Sigchos presentaron un número de alelos entre 36 a 47, con alelos privados entre 1 a 6. Por otro lado, los individuos de Quilotoa presentaron el menor número de alelos (29), de los cuales 6 fueron exclusivos.

7.4.2. Diversidad genética del mortiño

El análisis de varianza molecular (AMOVA) evidencia que el 78.59% de la diversidad genética proviene de la variabilidad intrapoblacional, el 11.28% proviene de la variabilidad interpoblacional y el 10.12% proviene de la variabilidad entre regiones (Figura 3).

Los valores de heterocigosidad esperada por locus (H_e) varían entre 0.41 y 0.84 con un promedio de 0.72. Los valores de heterocigosidad observada por locus (H_o) oscilan entre 0.31 a 0.66 con un promedio de 0.46 (Tabla 2).

Los resultados de la heterocigosidad observada (H_o) analizada en cada localidad varían entre 0.21 a 0.56. Los individuos de la localidad Parque Nacional Cotopaxi Sur presentan el mayor valor de H_o ($H_o=0.56$), mientras que el menor valor muestran los individuos de la localidad de Quilotoa ($H_o=0.21$). Por otro lado, el mayor valor de heterocigosidad esperada considerando las localidades, fue en los individuos del Parque Nacional Cotopaxi Norte ($H_e=0.58$) y el menor valor fue en los individuos de la localidad de Quilotoa ($H_e=0.32$). En la mayoría de localidades se evidencia que la heterocigosidad esperada es ligeramente mayor que la observada a excepción de Cotacachi-Cayapas, y el Parque Nacional Cotopaxi Sur (Tabla 3).

Los resultados de las distancias genéticas F_{st} de Weir & Cockerham permiten conocer el nivel de diferenciación genética entre los individuos de las localidades. Entre los individuos de las localidades de Parque Nacional Cotopaxi Norte y el Parque Nacional Sur se observa la menor diferencia genética (0.061). Mientras que la mayor diferenciación genética se encuentra entre los individuos de las localidades de Quilotoa y San Pablo (0.243) y entre los individuos de Quilotoa y Cotacachi-Cayapas (0.256). Los demás individuos de las localidades muestran una alta similitud genética entre

ellas (Tabla 4). Estos resultados también se pueden observar en la Figura 4, donde los cuadros más oscuros pertenecen a las distancias genéticas más altas entre los individuos de Quilotoa y el resto de individuos de las demás localidades.

El análisis del dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining (utilizando las distancias genéticas entre los individuos de las localidades) se observa que existe una mayor distancia genética en los individuos de Quilotoa con respecto al resto de localidades. Adicionalmente, se observan tres agrupaciones: 1) Cotacachi-Cayapas, San Pablo, Cashaloma y Mojanda, 2) Parque Nacional Cotopaxi-Norte, Parque Nacional Cotopaxi-Sur, Ilinizas y Sigchos y 3) Quilotoa. Estas agrupaciones hacen referencia a las tres regiones propuestas por Cobo *et al.*, 2016, las cuales se encuentran relacionadas con su ubicación geográfica (Figura 5).

Por otro lado, el análisis del dendrograma utilizando las distancias genéticas entre individuos muestra que no existe ningún tipo de agrupación definida entre los individuos de las diferentes localidades, a excepción de los individuos de Sigchos y Quilotoa que se agrupan de forma separada (Figura 6).

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) (Figura 7), se observa que los individuos de las localidades se distribuyen indistintamente a excepción de los individuos de la localidad de Quilotoa que se agrupan en el cuadrante inferior derecho. Adicionalmente, se observa una agrupación de los individuos de la localidad de Sigchos ligeramente separada del resto de individuos de las otras localidades.

El análisis de red de migración (Figura 8 y 9) muestra que existe un alto flujo génico debido a fenómenos de migración entre los individuos de todas las localidades a excepción de los individuos de Quilotoa y Sigchos. Se puede evidenciar que dentro de la Región 2 existe un flujo bidireccional entre los individuos de las localidades de

Parque Nacional Cotopaxi-Norte e Ilinizas. Existe un flujo genético principalmente de norte a sur (desde la región 1 hacia la región 2) donde los individuos de la localidad Parque Nacional Cotopaxi-Norte posiblemente tienen flujo genético con los individuos de las localidades de Cashaloma, Cayapas y Parque Nacional Cotopaxi-Sur. Se ve también que los individuos de la localidad de Ilinizas tienen flujo genético con los individuos de Mojanda y Lago San Pablo. Sin embargo, los individuos de las localidades de Sigchos y Quilotoa se encuentran completamente aislados (no reciben flujo genético) del resto de sitios analizados.

7.4.3 Estructura poblacional

En el análisis de estructura poblacional mediante el software STRUCTURE, se probó un valor de $K=7$ porque presentó el valor más elevado de ΔK 5.807 (Figuras 10). En esta figura se observa la predominancia de una línea ancestral en todos los individuos de las localidades (color café) a excepción de los individuos de las localidades de Quilotoa (color rojo) y Sigchos (color celeste), los cuales presentan un linaje ancestral propio e independiente (Región 3). Finalmente, no se observa una estructura poblacional entre los individuos de las localidades dentro la Región 1 y 2.

Los resultados del software de Bottleneck arrojan valores p mayores a 0.05 para los individuos de todas las localidades, indicando que en ninguna localidad existe un fenómeno de cuello de botella (Tabla 5).

7.4.4 Análisis de nivel de parentesco y endogamia

Para analizar el nivel de parentesco y endogamia entre los individuos de mortiño de todas las localidades, se utilizó el coeficiente de coancestro (θ_{xy}) evaluado por el

método de Wang mediante el uso del software *Coancestry*. Valores positivos indican la posibilidad de parentesco entre los individuos analizados por un posible evento de endogamia, mientras que valores negativos muestran que los individuos no se encuentran emparentados, por lo que puede existir flujo genético con los individuos del resto de localidades.

En este estudio, el coeficiente global de coancestro fue de -0.134 ± 0.0017 . La Tabla 6 indica la comparación de los coeficientes de las localidades en pares donde se pueden observar valores negativos entre todas las localidades analizadas. Adicionalmente, los coeficientes dentro de cada localidad muestran ser positivos en su mayoría, a excepción de los individuos de las localidades de Mojanda, Parque Nacional Cotopaxi Norte y Quilotoa.

8. Discusión

8.1 Diseño de primers homólogos de mortíño

Mediante el secuenciamiento del genoma de un individuo de mortíño, se logró identificar un alto número de loci SSR y sus respectivas zonas flanqueantes de manera rápida y económica (Griffiths *et al.*, 2010). Sin embargo, de este set generado fue importante seleccionar los loci con motivos de tres o más nucleótidos. Esta selección se debe a que motivos de entre 1 a 2 nucleótidos pueden producir bandas de tartamudeo (*stutter bands*) producidos por el deslizamiento de la Taq polimerasa durante la amplificación. Este fenómeno puede producir picos falsos generando dificultades al momento de analizar los alelos, especialmente en individuos heterocigotos (Guichoux *et al.*, 2011).

8.2 Estandarización de primers homólogos de mortño

Se evaluaron 30 primers homólogos para mortño, de los cuales el 86.67% (26 primers) amplificaron exitosamente. Debido a que en este estudio se utilizaron primers homólogos se esperaba obtener amplificación con todos los marcadores. No obstante, la falta de amplificación en ciertos marcadores puede ser explicada por mutaciones que ocurren en las regiones flanqueantes a los microsatélites, evitando la unión de los primers y por ende, la amplificación de los respectivos loci (Reddy *et al.*, 2002).

8.3 Genotipado y evaluación del desempeño de los marcadores microsatélites de mortño

Del grupo original de 30 marcadores, se obtuvo un set de 14 primers microsatélites descritos en la Tabla 2. En el resto de marcadores no se logró obtener un genotipado correcto pese a que existió amplificación (Figura 1). La falta de incorporación de la cola (*Tail A*) marcada podría deberse a que el PCR que se realizó tuvo 30 ciclos de amplificación cuando existen reportes que sostienen que un número mayor de ciclos de amplificación (35-40 ciclos) ayudan a la incorporación de la cola al fragmento complementario. Con un menor número de ciclos seguramente no se generaron suficientes fragmentos marcados para lograr una fluorescencia detectable (Culley *et al.*, 2013).

En este estudio, se evidenció que existen valores altos de PIC en cada uno de los locus. El valor PIC es utilizado para analizar el grado informativo que presenta un marcador genético. Si este valor se encuentra más cercano a 0, no existe variación alélica en tal locus, mientras que si se encuentra más cercano a 1 presenta una mayor cantidad de alelos detectados (Anderson *et al.*, 1993). Se obtuvieron valores de PIC entre 0.36 a 0.86; por lo que es un set de marcadores microsatélites SSR informativos.

En otro estudio realizado utilizando microsátelites SSR para detectar diversidad alélica del arroz (*Oryza sativa* L.) se evidenciaron valores de PIC entre 0.675 a 0.860, reflejando la alta capacidad de los microsátelites de analizar la diversidad alélica y frecuencias entre las variedades (Nachimuthu, 2015).

En el estudio realizado por Cobo *et al.*, 2016 se analizó la diversidad genética del mortiño utilizando primers heterólogos específicamente diseñados para arándano azul-blueberry. Se identificó un número promedio de alelos de 4.46 por locus y una heterocigosidad esperada promedio de 0.49. Sin embargo, con el uso de primers homólogos, el promedio de número de alelos detectados fue el doble (8.14) y la heterocigosidad esperada promedio fue mayor ($He=0.72$). Diferentes estudios han demostrado que la utilización de primers heterólogos disminuye el nivel de polimorfismo y aumenta el número de loci monomórficos (Borges, 2007; Brown *et al.*, 1996).

8.4 Análisis de datos

8.4.1 Diversidad alélica del mortiño

La riqueza alélica determina el número de alelos encontrados en cada uno de los loci estudiados (Eguiarte *et al.*, 2010). Como se observa en la Tabla 2, el número de alelos por locus varía entre 3-14 alelos. Dicho número es considerablemente bajo comparado con otras especies dentro del género *Vaccinium*, como *Vaccinium angustifolium* y *Vaccinium corymbosum*, los cuales presentan 22.4 y 17 alelos por locus, respectivamente (Boches *et al.*, 2006; Debnath, 2014). El bajo número de alelos por locus puede ser explicado porque se utilizaron muestras de mortiño recolectadas en tan solo tres provincias del norte de la sierra ecuatoriana reduciendo la probabilidad de

encontrar alelos nuevos (Cobo *et al.*, 2016), comparado con los estudios de las otras especies, en donde el rango de distribución fue mayor.

8.4.2 Diversidad genética del mortiño

Para conocer la diversidad genética de una especie, se debe analizar distintos índices como son la heterocigosidad esperada, variabilidad genética, distancias genéticas y flujo genético entre los individuos de las localidades analizadas (Jove, 1993).

La heterocigosidad permite conocer la proporción de heterocigotos en los individuos de cada localidad. Valores altos de heterocigosidad indican un alto número de individuos heterocigotos en la población y más variabilidad de alelos. En este estudio, se observó un valor relativamente alto de heterocigosidad esperada promedio ($H_e=0.72$). La heterocigosidad observada (H_o) promedio fue de 0.46. Esta discrepancia entre los valores de H_e y H_o se puede asociar con fenómenos ecológicos y evolutivos que pueden provocar una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg (Wigginton *et al.*, 2005). Uno de estos fenómenos puede ser la endogamia, que en el caso del mortiño puede ser producto del aislamiento geográfico de algunas de las localidades en estudio. Esto provoca que los individuos se reproduzcan con aquellos cercanos por lo que se favorece la homocigosis y por ende la disminución de la heterocigosidad observada. (Debnath, 2014).

En el estudio de Cobo (2014) utilizando primer heterólogos, se reportaron valores promedio bajos de H_o (0.357) y H_e (0.49) para el mortiño. Estudios de diversidad genética en especies dentro del mismo género como *V. corymbosum* ($H_o=0.53$; $H_e=0.86$) (Debnath, 2014) y *V. vitis-idaea* L ($H_o=0.568$; $H_e=0.81$) (Persson

y Gustavsson, 2001), mostraron una diversidad genética más alta. La diferencia entre la heterocigosidad esperada entre el mortño y las especies del mismo género puede deberse al efecto de los alelos nulos, un artefacto común de las reacciones de PCR al amplificar los loci SSR con primers heterólogos. Estudios de secuenciamiento indican que los cambios en las regiones flanqueantes también se producen a una velocidad no despreciable (Angers y Bernatchez, 1997). Esta variación puede evitar que el primer se hibride con el ADN molde durante el paso de *annealing* en una reacción de PCR (Chapuis y Estoup, 2007). Otra causa de los alelos nulos incluye la amplificación preferencial de alelos cortos (cantidad o calidad inconsistente del molde de ADN) o el deslizamiento de la polimerasa durante la amplificación (Shinde *et al.*, 2003).

Otro índice importante es la variación genética intra e interpoblacional. A partir de los resultados de AMOVA, se puede inferir que la variabilidad proviene principalmente de la variación genética intrapoblacional (78.59%), mientras que existe un bajo porcentaje de variación interpoblacional (11.28%). Estos resultados son similares a los obtenidos por Cobo, 2014 donde obtuvo 85% de variación genética intrapoblacional y 14% de variación genética interpoblacional. En estudios realizados con *V. myrtilus* usando ISSR, el análisis de la varianza molecular indicó que el 15% de la varianza genética total era atribuible a la diversidad entre las poblaciones y el resto (85%) a la diversidad dentro de las poblaciones (Zoratti *et al.*, 2015). Este bajo porcentaje en la variación interpoblacional se evidencia también con las distancias genéticas entre individuos de las diferentes localidades. Las distancias genéticas permiten conocer las similitudes genéticas entre los individuos de las localidades mediante sus frecuencias alélicas. Los valores de las distancias genéticas de *F_{st}* obtenidas para el set de datos utilizados en esta investigación evidencian que existe flujo génico entre los individuos de las distintas localidades analizadas debido a que

presentan valores cercanos a 0. Al generar una red de migración (Figura 8 y 9) se corroboró la idea de que existe flujo genético desde los individuos de las localidades de la Región 1 hacia los individuos de las localidades de la Región 2 (flujo genético desde el norte hacia el sur). En la Región 2 se observa un flujo genético bidireccional entre los individuos de las localidades.

Los distintos valores de los indicadores de diversidad genética discutidos anteriormente y la red de migración pueden explicarse por las características ecológicas del mortiño como son: el modo de reproducción cruzada mediante la polinización y la dispersión de semillas, factores que pueden influir para el aumento de la diversidad genética en las especies vegetales (Wang, 2014). Se ha reportado que existen especies dentro del género *Vaccinium* polinizadas por colibríes e insectos como las abejas, los cuales promueven en gran parte el cruzamiento y ayudan a la dispersión de semillas (Luteyn, 2002). Específicamente el mortiño presenta una disposición tubular de las flores, facilitando la polinización y dispersión, manteniendo un polimorfismo genético moderado entre los individuos (Luteyn, 2002).

No obstante, entre las Regiones 1 y 2 hay aproximadamente 100 km de separación y se reporta que las abejas pueden ayudar a la distribución del polen en un área de alrededor de 6 km únicamente (Van der steen, 2016), por lo que el flujo genético a tanta distancia puede que no sea posible. Sin embargo, este flujo se puede explicar debido a que existen individuos de mortiño no muestreados entre las Regiones 1 y 2, que podrían contribuir a que si se de este flujo genético hacia la Región 2 mediante polinización. Adicionalmente se podría pensar que las rutas de polinización de las abejas puedan estar modificadas por la existencia de centros poblados en el rango de distribución del mortiño (Luis, 2016).

Debido a que la Región 2 es la que recibe mayor cantidad de flujo genético, se puede sugerir que la mayor diversidad genética de mortiño podría estar concentrada en dicha región. Esta información puede ser importante para futuros muestreos, programas de conservación y mejoramiento vegetal.

Los valores de distancias genéticas (F_{st}) obtenidos para los individuos de la localidad de Quilotoa presentan distancias genéticas mayores (entre 0.135 y 0.256) (Tabla 4 y Figura 4) con relación a los individuos del resto de localidades, sugiriendo que no existe un flujo genético entre éstos. Esta diferencia también se puede evidenciar en el dendograma por localidades y por individuos, así como también en el PCoA (Figura 5, 6 y 7) donde los individuos de Quilotoa se agrupan separadamente de las demás localidades. Esto podría indicar el aislamiento geográfico de estas localidades descrito a continuación.

8.4.3 Estructura poblacional

Mediante el uso del software STRUCTURE basado en métodos de inferencia bayesiana, se estimó un valor óptimo de K de 7, que muestra un valor superior de ΔK . Los gráficos de coeficientes de asignación para los individuos de todas las localidades permiten concluir que no existe una estructura poblacional definida entre los individuos de mortiño analizados.

Los resultados de STRUCTURE muestran que existe un linaje en común para los individuos de todas las localidades (a excepción de Quilotoa y Sigchos). Este linaje común podría sugerir que los individuos de las localidades estuvieron unidos desde un inicio y posteriormente migraron hacia otras zonas geográficas. Por otro lado, Quilotoa y Sigchos presentan linajes independientes que podrían ser explicados por la presencia

de la Cordillera de los Andes que separa geográficamente estas dos localidades del resto.

Como se menciona anteriormente, los individuos de la localidad de Quilotoa se diferencian genéticamente del resto de individuos analizados de otras localidades, esto podría deberse a las diferencias altitudinales que existen con las demás localidades. Las plantas de Quilotoa fueron recolectadas a una altura de 4087 a 4109 msnm, a diferencia del resto de muestras que fueron recolectadas entre 3298 y 3728 msnm.

Las diferencias altitudinales pueden crear microambientes o cambios climáticos, los cuales pueden generar presión selectiva sobre varios alelos cambiando en cierto grado el genotipo de las plantas de Quilotoa (Cheplick, 2015). Además, los microambientes pueden generar diferencias en el tiempo de floración de las plantas de Quilotoa y el resto de localidades. Las diferencias altitudinales también pueden evitar el paso de los polinizadores hacia alturas elevadas (Byars *et al.*, 2009). El cambio en el genotipo de las plantas, las diferencias en el tiempo de floración y la restricción de los polinizadores pueden evitar el flujo genético entre localidades y acumular diferencias genéticas (Escudero *et al.*, 2007). Para poder probar estas hipótesis se debe realizar estudios del fenotipo, ecología, y geografía de las plantas que se encuentran en la localidad de Quilotoa.

Estas disimilitudes genéticas entre individuos ubicados en distintas altitudes también se ha reportado en distintos estudios. En el estudio realizado por Byars *et al.*, 2009 en hierba alpina, *Poa hiemata*, se observó diferencias genéticas significativas (*Fst*) entre distintos sitios altitudinales. Niveles similares de diferenciación por efectos altitudinales se encontraron en otros estudios como Murawski y Hamrick (1990) en

Aechmea magdalenae y en la investigación de Hirao y Kudo (2004) en *Peucedanum multivittatum*.

8.4.4 Análisis del nivel de parentesco y endogamia

Con el fin de profundizar en las diferencias genéticas de los individuos de las localidades de Sigchos y Quilotoa, se pueden utilizar diferentes programas como Coancestry. Estos utilizan la información genética para estimar la relación entre individuos dentro de una población donde no se tienen registros confiables sobre las relaciones genealógicas a lo largo de la historia. Estas relaciones son muy valiosas dentro de varias áreas de investigación como la evolución y conservación ya que permiten estimar las heredabilidades, minimizar la endogamia, y estudiar el aislamiento por distancia en poblaciones silvestres (Wang, 2011).

Si los individuos de una población se encuentran aislados, éstos no pueden dispersarse, por lo que el parentesco aumenta y una posible consecuencia es la endogamia. Si ocurre endogamia se puede alterar la proporción de homocigotos, provocando que exista una alta tasa de recesivos, exponiendo alelos a presión selectiva, por lo que puede que disminuya la diversidad genética y se pierdan alelos que afecten al *fitness* de la especie vegetal. Además, se pueden perder alelos importantes ligados a éstos que pueden ayudar al proceso de adaptación de las especies a nichos ecológicos o cambios climáticos (Frankham *et al.*, 2002).

Los coeficientes de Wang descritos en la Tabla 6 muestran un valor positivos para la localidad de Sigchos indicando que los individuos presentan un nivel de parentesco debido a un posible aislamiento. Esto se puede deber a la presencia de algún tipo de barrera geográfica que impida la migración de los polinizadores tanto insectos

como colibríes. También se puede explicar debido a un aislamiento por factores geológicos como son los periodos glaciales e interglaciales durante la era del Pleistoceno (Médial y Diadema, 2009). Los periodos glaciales crean masas de hielo que pueden aislar a los individuos durante miles de años, explicando así el linaje independiente que se observa en los individuos de Sigchos (Luteyn, 2002).

Contrario a lo esperado, los coeficientes de Wang en la Tabla 6 muestran un valor negativo para la localidad de Quilotoa, indicando que no existe un nivel de parentesco entre los individuos de esta localidad. Esta falta de parentesco se podría explicar por un posible flujo génico entre los individuos de esta localidad con aquellos de localidades ubicadas al sur de la región pero que no fueron muestreadas en este estudio. Por ejemplo localidades que provengan de la provincia de Tungurahua, Bolívar o Chimborazo.

Se sugiere que la diferenciación entre los individuos del sur con aquellos de las regiones 1 y 2, al norte, se deba a la presencia de masas de hielo durante los periodos glaciales en la Era del Pleistoceno. En periodos post-glaciales, las masas de hielo desaparecieron y crearon nuevos nichos ecológicos, permitiendo que las poblaciones nuevamente entren en contacto. Este fenómeno se conoce como “contacto secundario” o *secondary contact* (Murray y Hare, 2006). Para poder confirmar esta hipótesis es necesario realizar un estudio de diversidad genética de los individuos de las localidades ubicadas al sur de la sierra ecuatoriana.

9. Conclusiones

- Se obtuvo un set de 14 marcadores microsatélites tipo SSR que son polimórficos, por lo que pueden ser utilizados para estudios posteriores de diversidad genética del mortiño.
- El desarrollo de primers homólogos para mortiño permite capturar de mejor manera la riqueza alélica y diversidad genética del mortiño. Esto se ve reflejado en los valores de heterocigosidad esperada con primers homólogos ($He=0.72$) y primers heterólogos ($He=0.49$).
- Pese a que se utilizaron primers específicos para mortiño, el número de alelos y heterocigosidad esperada presentan valores relativamente altos comparados con otras especies dentro del mismo género como *V. corymbosum* y *V. vitis-ideae*.
- Se evidenció que existe una diversidad genética moderadamente alta del mortiño (0.72). De esta diversidad, el 78.95% corresponde a la diversidad intrapoblacional y el 11.28% a la diversidad interpoblacional.
- No existen diferencias genéticas entre las 9 localidades a excepción de dos individuos de la localidad de Quilotoa que se separan de las demás localidades debido a que tienen distancias genéticas altas.
- Se evidencia una red de migración de norte a sur causada por el flujo genético entre las regiones 1 y 2. Se observa además que dentro de la Región 2 se da un flujo genético bidireccional entre la provincia de Ilinizas y Parque Nacional Cotopaxi Norte. La Región 3 se encuentran completamente aislada del resto de localidades.
- La estructura poblacional obtenida en este estudio es diferente a la estructura obtenida por Cobo *et al.* (2016) donde se utilizaron primers heterólogos y

mayor número de muestras. Sin embargo, las estructuras poblacionales de ambos estudios concuerda que Quilotoa presenta un linaje ancestral definido que no se comparte con el resto de las localidades ,

- El coeficiente global de coancestry de -0.13414 muestra que los individuos analizados no se encuentran emparentados entre ellos, por lo que puede existir flujo génico con individuos de otras localidades no muestreadas, aumentando la diversidad genética y la capacidad de adaptarse frente a cambios climáticos.
- Estos marcadores microsatélites pueden servir como herramienta molecular para conocer la diversidad genética del mortiño y desarrollar programas de agricultura sostenible y mejoramiento vegetal.

10. Recomendaciones

- El uso de un mayor número de marcadores dentro de un estudio de diversidad genética permite la identificación de un mayor número de alelos, por lo tanto se recomienda aumentar el número de microsatélites polimórficos dentro del set de 14 marcadores microsatélites obtenido.
- Se recomienda utilizar estos primers homólogos para realizar un estudio de diversidad genética a lo largo de la sierra ecuatoriana.
- Se recomienda estudiar cómo se encuentra influenciada la diversidad genética y estructura poblacional en áreas protegidas vs zonas pobladas, para observar la influencia del ser humano sobre la diversidad genética del mortiño.
- Realizar una prueba de Mantel para confirmar la correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética entre las localidades analizadas.
- Para análisis posteriores se propone realizar primers para amplificar regiones mitocondriales o de cloroplastos, porque son de herencia materna, permitiendo realizar un análisis del proceso evolutivo, flujo génico, hibridación, biogeografía y relaciones filogenéticas entre especies cercanas al mortiño.

11. Bibliografía:

- Aguilar, Z. (2009). Guía de plantas útiles de los paramos de Zuleta, Ecuador. *EcoCiencia, Proyecto Paramo Andino. Programa de Apoyo a la Gestión Descetralizada de los Recursos Naturales en las Tres Provincias del Norte del Ecuador*, 99.
- Anderson, A., Churchill, A., Sutriquet, E., Tanksley, D. y Sorrells, M. (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36:181-186.
- Angers, B. y Bernatchez, L. (1997). Complex evolution of a salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution*. 14: 230-.238.
- Bailey, J., Gersten, E., Viach, E., & Olanyk, W. (1997). Effect of application date on absorption of nitrogen by highbush blueberry. *J. Amer.Soc.Hort.Sci*, 122, 422-426.
- Boches, P., Rowland, L., Bassil, N. (2005). Microsatellite markers for vaccinium from EST and genomic libraries. *Mol. Ecol. Notes* 5, 657-660.
- Boches, P., Rowland, L., Bassil, N. (2006). Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *J. Am. Soc. Hortic.* 131, 674-686.
- Borges, A. (2007) Variabilidade genética de *Partamona helleri* Friese, 1900 (Hymenoptera, Apidae). Universidade Federal de Viçosa, 48 pp.
- Blacket, M., Robin, C., Good, R., Lee, S., & Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 456-463.

- Brown, S., Hopkins, M., Mitchell, S., Senior, M., Wang, T., Duncan, R., Gonzalez, F., Kresovich, S. (1996). Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Theor Appl Genet.* 93: 190-198.
- Bruederle, L., Hugin, M., & Dignan, J. V. (1996). Genetic variation in natural populations of the large cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Ericaceae). *B Torr Bot Club*, 123, 41-47.
- Byars, S., Parsons, Y., Hoffmann, A. (2009). Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of Botany*. 103: 885-899.
- Bussmann, R. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1).
- Castoe, T., Poole, A., Koning, J., Jones, K., & Tomback, D. (2012). Rapid microsatellite identification from Illumina Paired-end Genomic sequencing in two birds and snake. *PloS One*, 7(2), e30953.
- Castoe, T., Streicher, J., Meik, J., & Ingrasci, M. (2012). Thousands of microsatellite loci from the venomous coral snake *Micrurus fulvius* and variability of select loci across populations and related species. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12000.
- CESA. (1993). *Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador*. Quito-Ecuador: Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas.
- Coba, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M., Yugsi, E., & Huachi, L. (2012). Estudio Etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *La Granja*, 16, 5-13.

- Cobo, M. (2014). *Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth) en tres provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi*. Quito-Ecuador: Tesis de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos, USFQ.
- Costa, R., Pereira, G., Garrido, I., Tavares, M., & Espinosa, F. (2016). Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Germplasm Variations. *PloS One*, 11(4).
- Courteau, J. (2012). *Encyclopedia of life*. Retrieved from *Vaccinium corymbosum*-Highbush blueberry: <http://eol.org/pages/484405/details>
- Cornuet J.M. and Luikart G., 1997 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Chapuis, M. y Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Bio Evol.* 24: 621-631.
- Cheplick, C. (2015). *Approaches to Plant Evolutionary Ecology*. Oxford University Press: New York
- Cho, Y.G., T. Ishii, S. Temnykh, X. Chen, L. Lipovich, S.R. McCouch, W.D. Park, N. Ayres, and S. Cartinhour. 2000. Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:713–722.
- Debnath, C. (2006). Propagation of *Vaccinium* in vitro: A Review. *International Journal of Fruit Science*, 6.2, 47-71.

- Debnath, C. (2014). Structured diversity using EST-PCR and EST-SSR markers in a set of wild blueberry clones and cultivars. *Biochem. Syst. Ecol.* 54, 337-347.
- Evanno et al., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14 , 2611 - 262
- 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.
- Escobar, L. (2009). *Conozcamos y usemos el mortiño*. Medellín: CORANTIOQUIA.
- Escudero, A., Benavides, G., Iriondo, J. (2007). Reproductive limits of a late-flowering high-mountain Mediterranean plant along an elevational climate gradient. *New Phytol.* 173 (2): 367-382.
- Estrella, E. (1986). *El pan de America: etnohistoria de los alimentos aborígenes en el Ecuador*. Consejo Superior de Investigaciones Científicas: Publicaciones del C.S.I.C conmemorativas del V centenario del descubrimiento de America.
- Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Felsenstein J., Kuhner M. (1994). A simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates, *Mol Biol Evol.* 11: 459-68
- Gapare WJ, Aitken SN, Ritland CE. (2005). Genetic diversity of core and peripheral Sitka spruce (*Picea sitchensis*) populations: implications for conservation of widespread species. *Biological Conservation* .123: 113–123.

- Griffiths, A., Miller, J., & Suzuki, D. (2000). *An Introduction to Genetic Analysis*. New York: W.H. Freeman.
- Griffiths, S., Fox, G., Briggs, P., Donaldson, I., Hood, S., Richardson, P., et al. (2016). A Galaxy-based bioinformatics pipeline for optimised, streamlined microsatellite development from Illumina next-generation sequencing data. *Conservation Genetics Resources*, 8(4), 481-486.
- Guichoux, E., Lagache, S., Warner, S., Chaumeil, P., Leger, P., & Lepais, O. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resource*, 11, 591-611.
- Guirardo, O., Cuéllar, A., & Prieto, S. (2008). Fitoquímica de género *Vaccinium* (Ericaceae). Camaguey, Cuba.
- Gutierrez, M., Pennington, R. Neaves, L., Milne, R. Madriñan, S., Richardson, J. (2017). Genetic diversity in the Andes: variation within and between the South American species of *Oreobolus* R. Br. (Cyperaceae). *Alp Botany*. 127: 155-170.
- Gupta, P. y Varshney, R. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*. 113: 163-185.
- Hancock, J. (1999). *Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms*. Oxford: Oxford University Press.
- Heald W (1951) Sky islands of Arizona. *Nat Hist* 60:56–63
- Hirao, A., Kudo, G. (2004). Landscape genetics of alpine-snowbed plants: comparisons along geographic and snowmelt gradients. *Heredity*. 93: 290-298.

- Hughes, A., Inouye, B., & Johnson, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, *11*, 609-623.
- Jove, M., (1993). Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca. Trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- Korner C. 1999. Alpine plant life: functional plant ecology of high mountain ecosystems. Berlin: Springer.
- Kron, K., Powell, A., & Luteyn, J. (2002). Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from matK and nuclear ribosomal ITS regiones, with comments on the placement of Satyria. *America Journal of Botany*, *89*, 327-336.
- Lehert, D. (2008). *The fruit Growers News* . Retrieved from Great American Publishing, USA : <http://www.fruitgrowersnews.com/pages/arts.php?ns=908>
- Levesque E, Henry GH. R, Svoboda J. (1997). Phenological and growth responses of *Papaver radicum* along altitudinal gradients in the Canadian high arctic. *Global Change Biology*. *3*: 125–145.
- Lewis, W., Kennelly, E., Wedner, G., & Fast, D. (1991). Rithalistic use of the holly *Ilex guayusa* by Amazonian Jivara Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, *33*, 25-30.
- Life Technologies. (2014). *DNA fragment analysis by capillary electrophoresis*. Thermo Fisher Scientific.

- Loján, L. (2003). El verdor de los andes ecuatorianos realidades y promesas. *Proyecto Desarrollo Forestal Participativo en los Andes*, 296.
- Lorz, H., & Wenzel, G. (2005). *Molecular Markers Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*. Berlin: Springer.
- Luteyn, L. (2002). Diversity, adaptation and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vacciniaceae. *The Botanical Review*, 68, 55-87.
- MAGAP. (1988). Hoja técnica del mortiño-blueberry. *Ministerio de agricultura*, Quito-Ecuador.
- Margulies, E., Egholm, M., & Altman, W. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376-380.
- Médial, F. y Diadema, K. (2009). Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *Journal of Biogeography*. 36 (7): 1333-1345.
- McNeely, J., Miller, K., Reid, W., Mittermeier, R., & Wener, T. (1990). *Conserving the World's Biological Diversity*. Washington, DC: IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US and the World Bank.
- Mosquera, J. (2015). *Estudios preliminar de diversidad genética de I. guayusa en la Amazonia ecuatoriana mediante marcadores moleculares ISSRs*. Universidad San Francisco de Quito: Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos Biotecnológicos .
- Murawski, D. y Hamrick, J. (1990). Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalena*. *Amer. J. Bot.* 9: 1201-1208.

- Murray, M., y Hare, M. (2006). A genomic scan for divergent selection in a secondary contact zone between Atlantic and Gulf of Mexico oysters, *Crassostrea virginica*. *Molecular Ecology*. 15. 4229-4242.
- Noboa, V. (2010). Efecto de seis tipos de sustratos y tres dosis de ácido naftalenacético en la propagación vegetativa de mortño (*Vaccinium floribundum*). *Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Recursos Naturales Escuela de Ingeniería Forestal*, Riobamba-Ecuador.
- Ohsawa T, Tsuda Y, Saito Y, Sawada H, Ide Y. 2007. Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu mountains, central Japan. *International Journal of Plant Sciences* 168: 333–340.
- Perez, M., Besnard, G., Dorado, G., & Hernandez, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PloS One*, 8: e70507.
- Persson HA, Gustavsson BA (2001) The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Mol Ecol* 10:1385–1397
- Pritchard, J., Stephens, K., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- R Core Team. 2013. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>
- Schmidt, D., & Sobota, A. (1984). Efficacy of cranberry juice and ascorbic acid in acidifying the urine in multiple sclerosis subjects. *J. Community Health Nurs*, 159-169.

- Schreckinger, M.E. Wang, J. Yousef, G, M. L. y Gonzalez, E. (2010). Antioxidant Capacity and in vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 58: 8966-8976.
- Shinde, D., Lai, Y., Sun, F., and Arnheim, N. 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Res.* 31: 974-980.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodohl, P., Kleinhans, D. (2016). *Directional genetic differentiation and relative migration*. Extraído el 24 de noviembre del 2017 desde <https://arxiv.org/pdf/1304.0118.pdf>
- Song, G., & Hancock, J. (2012). Recent Advances in Blueberry transformation. *International Journal of fruit science*, 12, 316-332. Saghai-Maroo M. A., K. M. Soliman. A. Jorgensen and R. W. Allard, (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8019.
- Slatkin, M. (1994). Gene flow and population structure. *Ecological Genetics* , 3-5.
- Srivastava, P., Narula, A., & Srivastava, S. (2005). *Plant Biotechnology and Molecular Markers*. New Delhi: Anamya Publishers.
- Tansley, S., Young, N., Paterson, A., & Bonierbale, M. (1989). RFLP Mapping in Plant Breeding: New Tools for an Old Science. *Nature Biotechnology*, 7, 257-264.
- Torres, A.F., Arias, A., Arahana, V., Torres, M. (2008). *Preliminary assesment of genetic diversity and phenetic relations for section by means of heterologous SSR markers*. *Crop Sci.* 48. 2289-2297.

- Trujillo, D. (2008). *Cultivo in vitro del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)*. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- USDA. (2012). *ERS*. Retrieved from U.S blueberry Industry: <http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1765>
- Van der Steen, J. (2016). *The colony of the honeybee (Apis mellifera L) as a bio-sampler for pollutants and plant pathogens*. Tesis para obtener el doctorado. Wageningen University.
- Varshney, R., Graner, A., & Sorrells, M. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends Biotechnol*, 23, 48-55.
- Vierira, M., Santini, L., Diniz, A., & Munhoz, C. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetic and Molecular Biology*, 39, 312-328.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., & Eggen, A. (2002). A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet Set Evol*, 34, 275-305.
- Weir, J.T. (2006). Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution*, 60, 842–855.

- Weir, B. y Cockerham, C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population-Structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- Wang, J. (2011). Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*. 11: 141-145.
- Wang, Z., Kang, M., Gao, J., Zhang, Z., Yingyue, L., Wu, R., Pang, X. (2014). High-Level Genetic Diversity and Complex Population Structure of Siberian Apricot (*Prunus sibirica* L.) in China as Revealed by Nuclear SSR Markers. *PLoS One*. 9: 10.1371/journal.pone.0087381
- Wang, J. (2014). Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: and assessment of current methods. *J. Evo. Biol.* 27: 518-530.
- Wigginton, J., Cutler, D., Abecasis, G. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg Equilibrium. *AJHG*. 76 (5): 887-893.
- Wright, J. (1994). Mutation at VNTRs: Are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome*, 37, 345-347.
- Wright S (1978) Evolution and Genetics of Populations: Variability within and among Natural Populations. *University of Chicago Press*, Chicago, 465 pp
- Zoratti L., Jaakola L., Häggman H., Giongo L. (2015). Modification of sunlight radiation through colored photo-selective nets affects anthocyanin profile in *Vaccinium* spp. berries. *PLoS ONE*
10:e0135935 10.1371/journal.pone.0135935

12. Tablas:

Tabla 1: 30 marcadores microsatélites seleccionados de la lista de 357 marcadores generado por el diagrama de flujo descrito en Griffiths *et al.*, 2016 junto con su temperatura de *annealing* estandarizada.

Primers	Forward	Reverse	Motifs	Ta (°C)
Mo001	AACCTGTACAAGTCTACCCCTACCG	TAATAACAGAACATCAGTGCAAGGC	TTCCTG(48)	58
Mo002	CAAATAACCCTCAAACACACACC	TTTATCATTATCCTACAGCGTACC	TTTGG(50)	58
Mo003	CTACCCATCCAACCACCTAACC	CTGTCTGCTCTTTCTCTAGTTCC	ATGG(36)	NE
Mo004	GAGGTATTGGAATCCTTGATGG	CTCTCCCCTCAACTCTTCCC	TCC(33)	58
Mo005	TAGAGATTCATCTCCATCCTTTTGC	GTCCATTAGGGTTCCAAAAGTGC	ACC(33)	58
Mo006	GTTTGGAAGATCTCGCTGAGTAGG	CAGTAGAACCACCTTACCCTGTAGC	AAC(27)	63
Mo007	GAAGCCTGGTCAGTCCTTTCC	CACTAGGAGTCTGACTTTCCTCTGC	TGC(24)	63
Mo008	ACTACCCTGCCACTCTCACTACC	CGGACCCAGAGTTAGGATAATACC	ACC(27)	63
Mo009	TATTCTTATGTTCTGCTCGTAGGC	TTTCTGCTAGCTGTTGTTGTAACG	AGT(24)	63
Mo010	TAGACAACCACTTTCTTTGGTTTCC	AATAAGTCTTGCTTTGTACCTTGCC	TTC(30)	63
Mo011	GCGAGAGTATTGGTGTTCATGC	CAGGTATAGATACTGGGTTTGGAGG	TTC(24)	63
Mo012	TGTTACGCTTATTACGTTGTGTTGG	TTACAGTTGACTTGTCTTATGCC	ACC(24)	60
Mo013	AGAGTACCATTTGGGTTAGTTTTGC	GACCAAAACAGTAGAAAACGACAGC	TTC(33)	60
Mo014	CTTTAAATGGAACCCCTCTGTAGG	AATACATACAATCTCAGGCAAAGGG	ATT(30)	60
Mo015	TAAATCCAAAAGGACAATCCATCC	AACATGGGTTTAGCGTAGGAGACG	TTC(27)	60
Mo016	GAAGAAGAAATGGTGAGACAACTGC	AAGAAGATTGACTAGGGAGACATCG	TTC(33)	60
Mo017	AAAACGTAGTTGGACAAACGATACG	GGTGGTTGTGGCCAAAATAGG	ATT(42)	NE
Mo018	ATTCGGGTATGGAGAGAGAAAGAGG	ACACCAACAAACCCGAAAATAACC	TCC(27)	60
Mo019	AACCTGTGTAATCTCACCCACTACC	ATAGATGAGGTGCAACAAGAGTTGG	AAC(33)	58
Mo020	CTACATTTTACCCGGTCACTTTTGC	CACACTAGTTACAAGAGCATTTTCCC	ATT(33)	60
Mo021	CATGTTTTGGTCTAGTTGATAACCC	GATGCTTCTAGAGCCTTTATTGC	TTC(33)	60
Mo022	CTTTAGAAACACGAAGTGACAGACC	TAGCTAATAGGTCAAGGTTCAAGG	TTC(30)	NE
Mo023	GACGACCAGAATAAAGAAGAGAAAGG	CTGAAGCCGACATATAGAACTTGG	ATT(24)	60
Mo024	TGTTGCTTCTTTGTTTCTACCC	TTAGAGTTCTAAGCCAACAACCTCG	ATC(24)	60
Mo025	GGTCAAAGGAGGAGAATAATAGCC	TGTCTCTGCCATTTTAATGTTACC	TTC(54)	60
Mo026	AAGGGGCATCACTGTAATAGTATCG	GAACGAAATCATCGTCTTACG	TC(30)	60
Mo027	CTTACCATGGTTGTAGCATTTTCCC	GTCCGTCATTTGTTATGGATAAGG	AT(20)	60
Mo028	TGCTTTCATCTATTGACCTTATCGG	GGGTGTCGTATCAGTAATCTCTCG	AC(18)	NE
Mo029	ACACCCTCAACTCAATACAGTGTGC	TGATGAGAATCCACCATTTTATGTC	TC(30)	60
Mo030	TAGACAACCAAGCTCATTTTGATCG	CACTTAGAACAGGAACTCACCTTGC	TC(18)	60

Ta (°C): temperatura de annealing estandarizada. NE: primer no estandarizado. Obtenido por Jenniffer Rowntree, Manchester Metropolitan University

Tabla 2: Resumen de la información proporcionada por 14 marcadores tipo microsatélites específicos para mortiño analizados en 60 muestras de mortiño procedentes de la sierra ecuatoriana

Locus	Primer sequence (5'-3')	Motivo	Fluoróforo	Ta (°C)	Tamaño esperado (pb)	Na	Ho	He	PIC
M001	F: AACCTGTACAAGTCTACCCCTACCG R: TAATAACAGAACATCAGTGCAAGGC	TTCCTG (48)	VIC	58	327-369	8	0.54	0.72	0.69
M002	F: CAAAATAACCCCTCAAACACACACC R: TTTATCATTATCCTACAGCGTCACC	TTTGG(50)	PET	58	158-163	3	0.34	0.43	0.38
M005	F: TAGAGATTCATCTCCATCCTTTTGC R: GTCCATTAGGGTTCCAAAAGTGC	ACC(33)	FAM	58	210-249	11	0.37	0.76	0.72
M007	F: GAAGCCTGGTCAGTCTTTCC R: CACTAGGAGTCTGACTTTCTCTGC	TGC (24)	PET	63	285-294	3	0.33	0.42	0.37
M008	F: ACTACCTGCCACTCTCACTACC R: CGGACCCAGAGTTAGGATAATACC	ACC (27)	VIC	63	336-366	8	0.31	0.48	0.45
M009	F: TATTCTTATGTTCTGTCCTCGTAGGC R: TTTCTGCTAGCTGTTGTTGTAACG	AGT (24)	NED	63	402-408	3	0.44	0.41	0.36
M010	F: TAGACAACCACTTTCTTTGGTTTCC R: AATAAGTCTTGCTTTGTACCTTGCC	TTC (30)	NED	63	292-307	6	0.4	0.45	0.41
M011	F:GCGAGAGTATTGGTGTTTCATGC R: CAGGTATAGATATACTGGGTTTGGAGG	TTC(24)	VIC	58	292-307	10	0.52	0.57	0.53
M015	F: TAAATCCAAAAGGACAACCCATCC R: AACATGGGTTTAGCGTAGGAGACG	TTC(27)	NED	60	211-303	10	0.52	0.63	0.57
M016	F: GAAGAAGAAATGGTGAGACAACCTGC R: AAGAAGATTGACTAGGGAGACATCG	TTC(33)	FAM	60	410-422	7	0.6	0.74	0.7
M018	F: ATTCGGGTATGGAGAGAGAAAGAGG R: ACACCAACAAACCCGAAAATAACC	TCC(27)	NED	60	211-324	11	0.59	0.72	0.68
M020	F: CTACATTTACCGGTCACTTTGC R: CACTAGTTACAAGAGCATTTTCCC	ATT(33)	PET	60	279-340	12	0.66	0.85	0.83
M021	F: CATGGTTGGTCTAGTTGATAACCC R: GATGCTTCTAGAGCCTTTATTGC	TTC(33)	FAM	60	306-365	14	0.25	0.84	0.82
M024	F: TGTTGCTTCTTTGTTTCTACCC R: TTAGAGTTCTAAGCCAACAACTCG	ATC(24)	VIC	60	354-372	8	0.62	0.81	0.78

Na: número de alelos detectados por locus; Ho: Heterocigosidad observada; He= heterocigosidad esperada; PIC=poly morphic information content por locus

Tabla 3: Parámetro utilizados para analizar la diversidad genética de 60 individuos de mortiño para cada localidad con el uso de R studio.

Provincia	Localidad	Na	Np	Ho	He
Imbabura	San Pablo	36	1	0.35	0.46
	Cashaloma	49	4	0.5	0.53
	Cotacachi-Cayapas	41	6	0.48	0.46
Pichincha	P.N. Cotopaxi-Norte	57	6	0.51	0.58
	Ilinizas	57	11	0.51	0.53
	Mojanda	47	5	0.38	0.49
Cotopaxi	P.N. Cotopaxi-Sur	48	6	0.56	0.54
	Sigchos	45	5	0.49	0.52
	Quilotoa	29	6	0.21	0.32

Na=número de alelos; Np= número alelos privados; Ho=heterocigosidad observada; He=Heterocigosidad esperada.

Tabla 4: Matriz de distancias genéticas de Weir y Cockerham (F_{st}) entre individuos de mortiño de las 9 localidades

		Cotopaxi			Imbabura			Pichincha		
		P.N.Cotopaxi-Sur	Sigchos	Quilotoa	San Pablo	Cashaloma	Cotacachi-Cayapas	P.N.Cotopaxi-Norte	Ilinizas	Mojanda
Cotopaxi	P.N.Cotopaxi-Sur	0	---	---	---	---	---	---	---	---
	Sigchos	0.113	0	---	---	---	---	---	---	---
	Quilotoa	0.171	0.22	0	---	---	---	---	---	---
Imbabura	San Pablo	0.088	0.135	0.243	0	---	---	---	---	---
	Cashaloma	0.095	0.118	0.18	0.0766	0	---	---	---	---
	Cotacachi-Cayapas	0.146	0.175	0.256	0.14	0.091	0	---	---	---
Pichincha	P.N.Cotopaxi-Norte	0.061	0.113	0.135	0.092	0.092	0.117	0	---	---
	Ilinizas	0.08	0.104	0.184	0.098	0.091	0.118	0.066	0	---
	Mojanda	0.118	0.129	0.187	0.114	0.083	0.169	0.094	0.111	0

Valores entre 0-0.05= baja diferenciación genética. Valores entre 0.05-0.15= moderada diferenciación genética. Valores entre 0.15-0.25= alta diferenciación genética (Wright, 1978).

Tabla 5: Valores p para evidenciar cuellos de botellas mediante el software Bottleneck para cada una de las localidades

Region	Localidad	Valor p prueba Wilcoxon (Bottleneck)
Region 1	Cashaloma	0.35754
	Cotacachi-Cayapas	0.7334
	Mojanda	0.32581
	San Pablo	0.68481
Region 2	CPNN	0.6698
	CPNS	0.32581
	Ilinizas	0.17261
Region 3	Sigchos	0.89258
	Quilotoa	0.19531

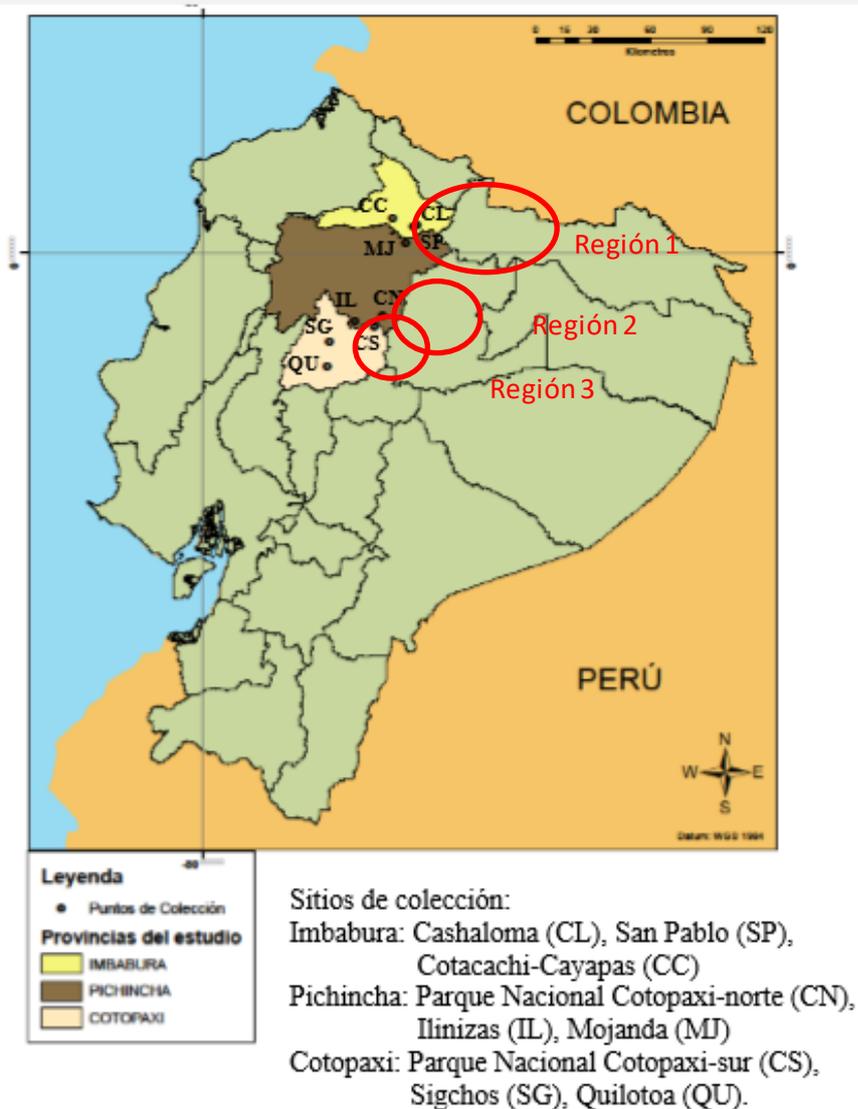
Valores p menores a 0.05 indican posible efecto de cuello de botella

Tabla 6: Coeficientes de coancestry calculados mediante el método de Wang para los 60 individuos mediante el software *Coancestry*

		Cotopaxi			Imbabura			Pichincha		
		CPNS	Sigchos	Quilotoa	San Pablo	Cashaloma	Cotacachi	CPNN	Ilinizas	Mojanda
Cotopaxi	P.N.Cotopaxi-Sur	-0.05155		---	---	---	---	---	---	---
	Sigchos	-0.17196	0.09388	---	---	---	---	---	---	---
	Quilotoa	-0.19314	-0.41753	-0.02053	---	---	---	---	---	---
Imbabura	San Pablo	-0.10195	-0.12732	-0.2664	0.09059	---	---	---	---	---
	Cashaloma	-0.15136	-0.20239	-0.33498	0.01756	0.06342	---	---	---	---
	Cotacachi-Cayapas	-0.2051	-0.28695	-0.31876	-0.13947	-0.0244	0.11285	---	---	---
Pichincha	P.N.Cotopaxi-Norte	-0.08227	-0.23052	-0.23459	-0.1754	-0.16986	-0.1411	-0.02363	---	---
	Ilinizas	-0.12125	-0.14308	-0.3779	-0.12438	-0.10701	-0.09385	-0.08437	0.07717	---
	Mojanda	-0.19811	-0.18563	-0.25649	-0.11705	-0.10489	-0.19554	-0.12519	-0.13065	-0.00113

Valores positivos indican un índice de parentesco entre las localidades

13. Figuras:



Región 1: Cashaloma (CL), Cotacachi-Cayapas (CC), San Pablo (SP), Mojanda (MJ)

Región 2: Ilinizas (IL), P.N. Cotopaxi-Norte (CN), P.N. Cotopaxi-Sur (CS)

Región 3: Sigchos (SG), Quilotoa (QU)

Figura 1: Mapa del Ecuador donde se observa los sitios de colección de muestras recolectadas por Cobo, 2014.

Mapa obtenido de Cobo, 2014.

A



B

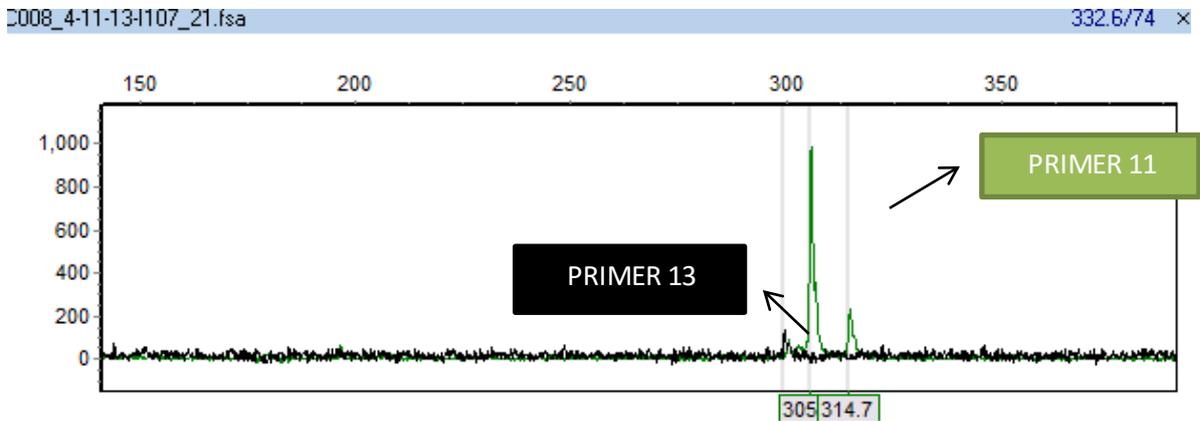


Figura 2: Amplificación y genotipado de muestra C008 con el primer 11 y 13. A. Gel de agarosa (1.5%) para evidenciar la amplificación de la muestra C008 con el primer 11 y 13. B. Genotipado en el software GeneMarker de primer 11 marcado con VIC y primer 13 marcado con NED.

Se evidencia que pese a que exista amplificación, no existe pico en el tamaño esperado.

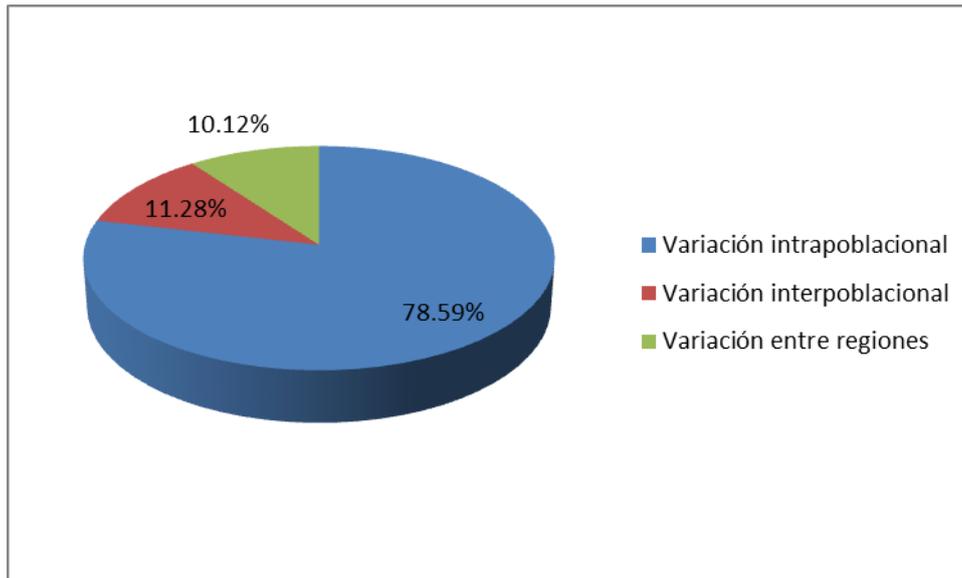


Figura 3: Análisis de variación molecular (AMOVA) intrapoblacional, interpoblacional y entre regiones. La variación intrapoblacional indica la variación genética entre todos los individuos analizados. La variación interpoblacional indica la variación genética entre las 9 localidades utilizadas. La variación entre regiones indica la variabilidad genética entre regiones establecidas por las coordenadas geográficas muestradas (Región 1, 2 y 3).

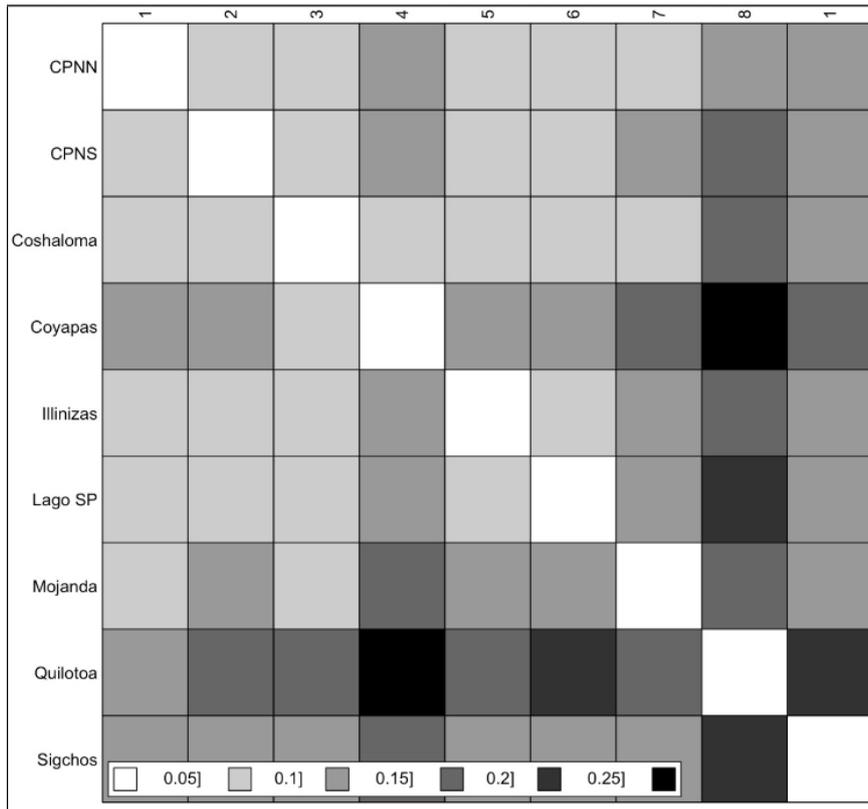


Figura 4: Gráfico de *Fst* para las 9 localidades de mortiño analizadas. Valores entre 0-0.05= baja diferenciación genética. Valores entre 0.05-0.15= moderada diferenciación genética. Valores entre 0.15-0.25= alta diferenciación genética (Wright, 1978).

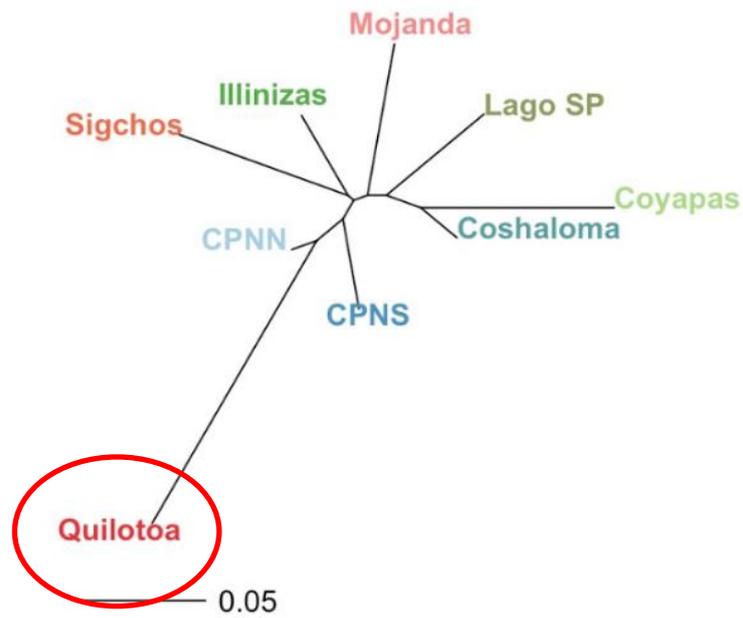


Figura 5: Dendrograma obtenido por metodo Neighbor Joining de las 9 localidades analizadas. La localidad de Quilota muestra una separación del resto de localidades. Lago SP= San Pablo; CPNS=Parque Nacional Cotopaxi-Sur; CPNN= Parque Nacional Cotopaxi Norte.

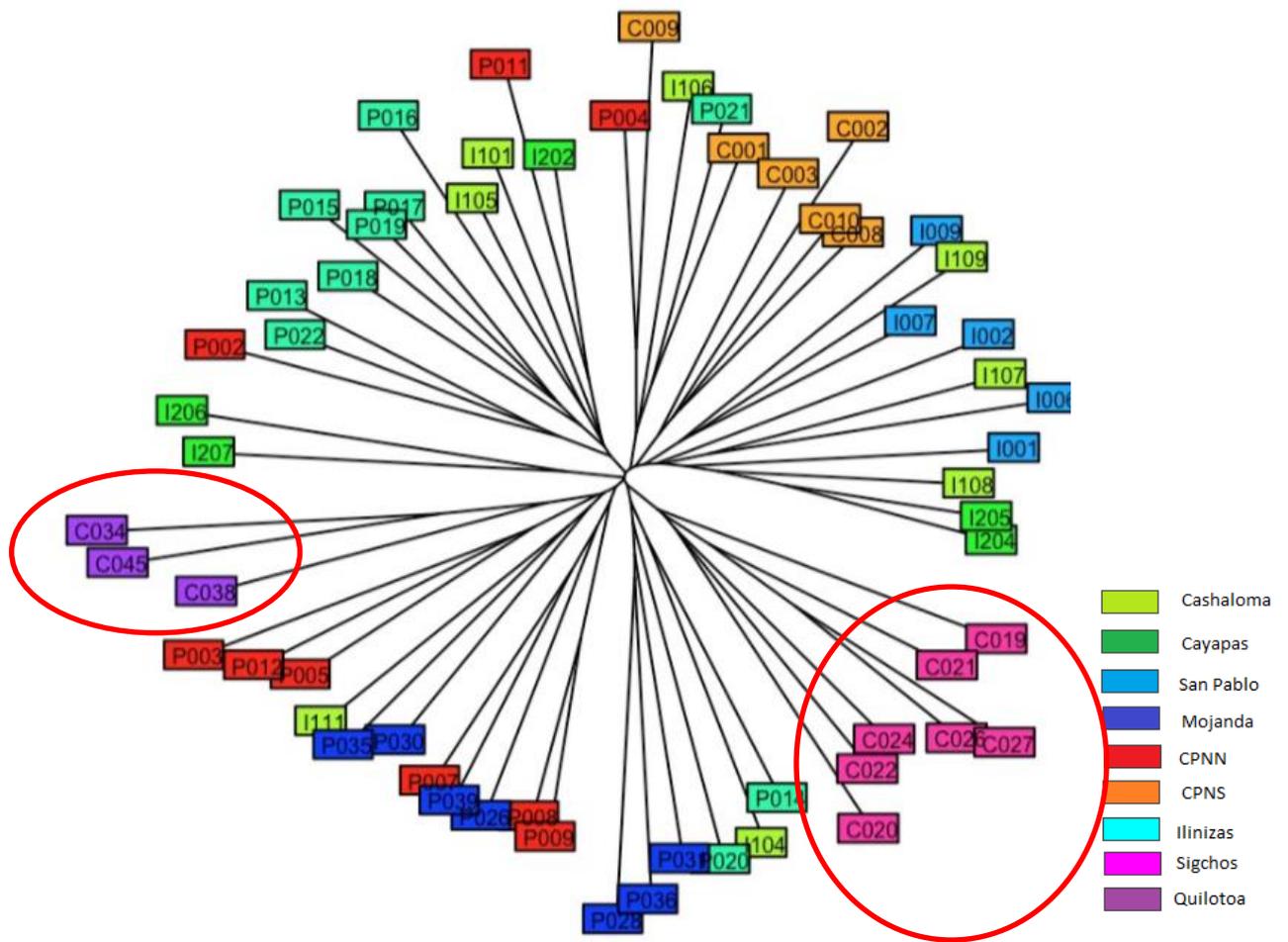


Figura 6: Dendrograma obtenido por método Neighbor Joining de los 60 individuos analizados. Se observa una agrupación de los individuos de Sigchos y Quilotoa.

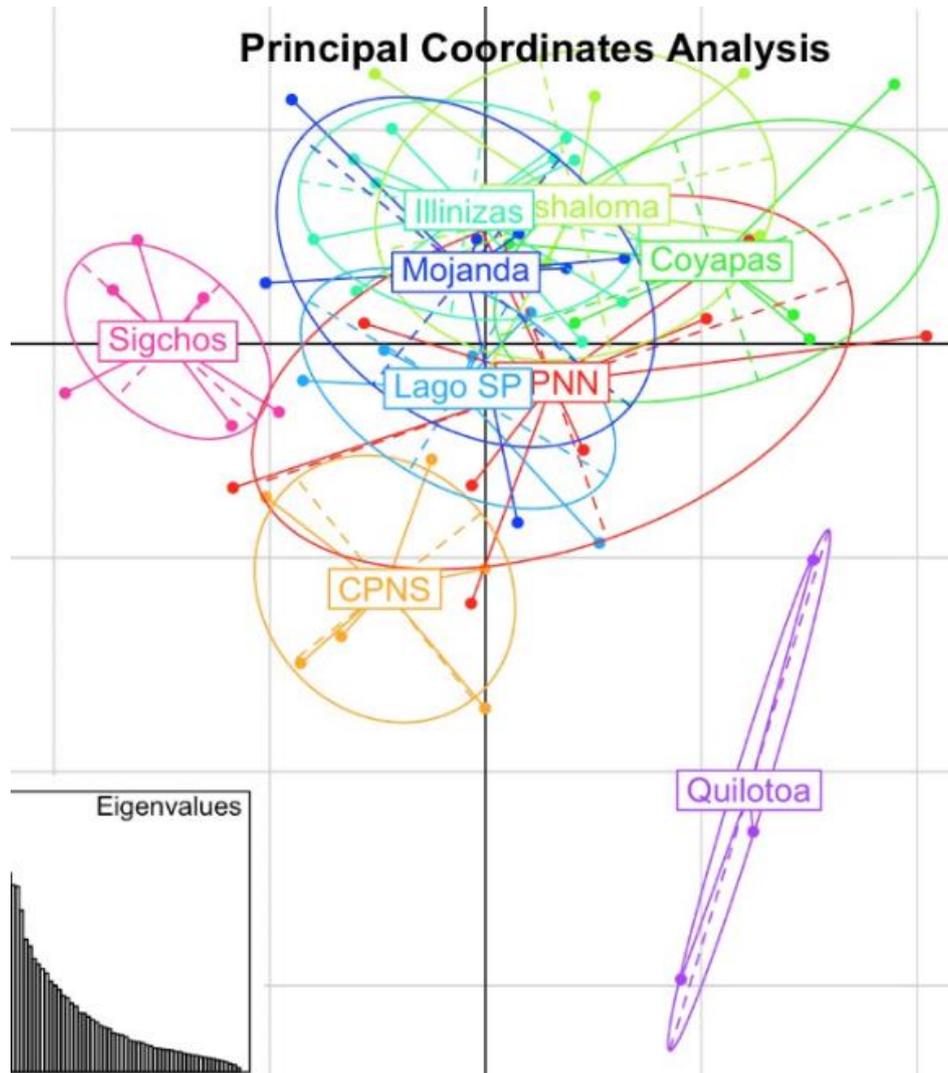


Figura 7: Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido de las 60 muestras analizadas. No se observa una separación clara entre los individuos a excepción de los individuos de Quilotoa que se muestran separados. Lago SP= San Pablo; CPNS=Parque Nacional Cotopaxi-Sur; CPNN= Parque Nacional Cotopaxi Norte.

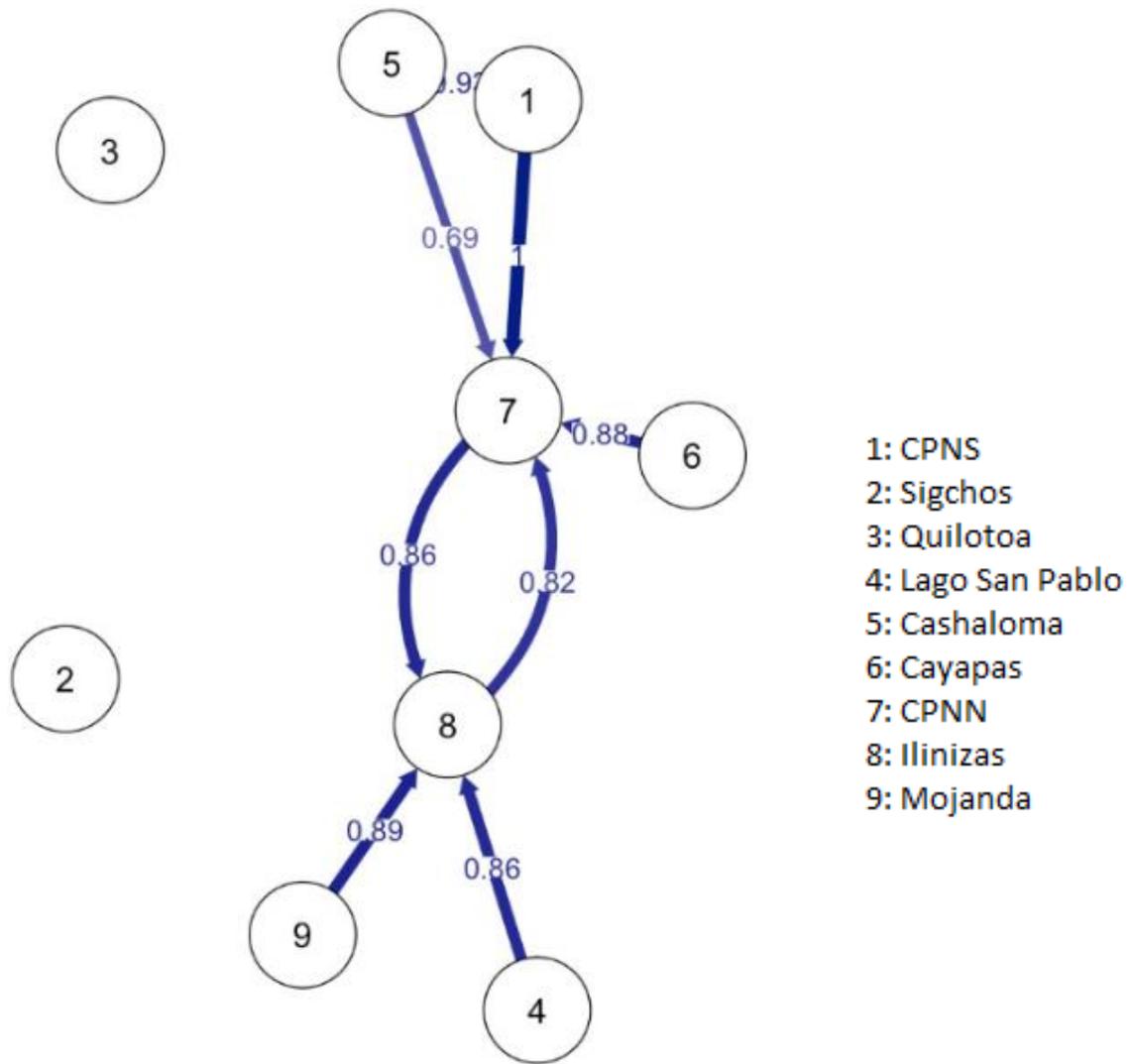


Figura 8: Red de migración entre las 9 localidades estudiadas. Filter Threshold 0.6 Nm.

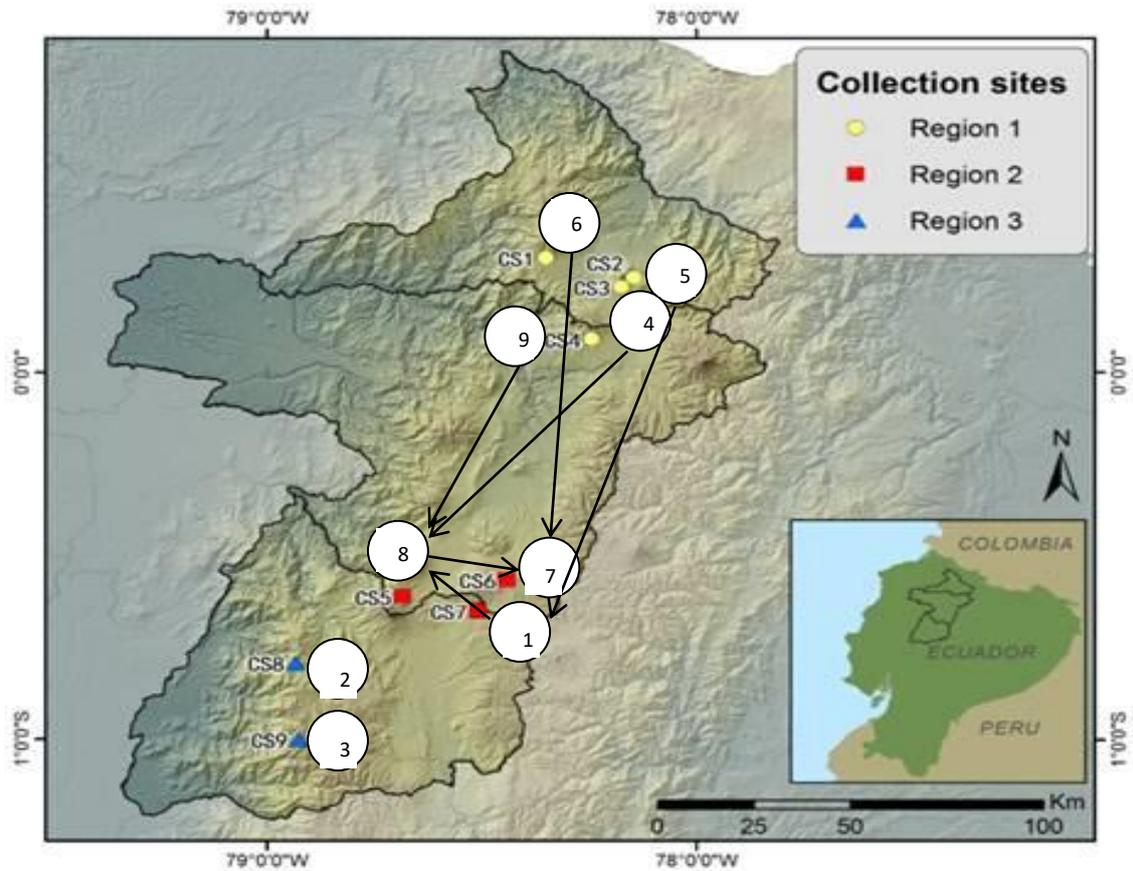


Figura 9: Red de migración entre las 9 localidades estudiadas sobre mapa geográfico. Mapa obtenido de Cobo *et al.*, 2016

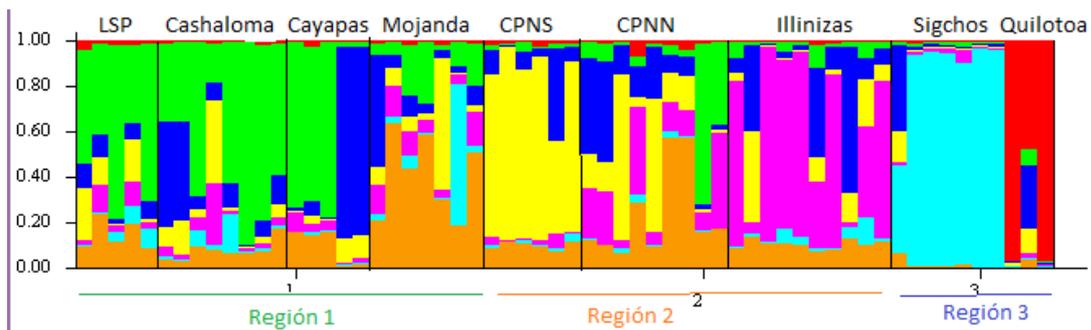


Figura 10: Gráfico de estructura poblacional del mortño (*Vaccinium floribundum* Kunth) utilizando un k óptimo de 7. LSP=Lago San Pablo; CPNS=Parque Nacional Cotopaxi-Sur; CPNN=Parque Nacional Cotopaxi Norte.

13. Anexos:

Anexo 1: 60 Muestras utilizadas para la estandarización y genotipado de marcadores tipo microsatélites seleccionados homólogos para mortíño.

Región	Localidad	No. muestra	Coordenadas	Altitud
Región 1	Reserva Ecológica Cotacachi-Cayapas	I028	N0 18.598 W78 21.031	3323 msnm
		I030	N0 18.672 W78 21.163	3334 msnm
		I031	N0 18.744 W78 21.221	3378 msnm
		I032	N0 18.745 W78 21.219	3370 msnm
		I033	N0 18.778 W78 21.166	3395 msnm
	Cashaloma	I016	N0 15.554 W78 08.793	3298 msnm
		I019	N0 15.551 W78 08.796	3307 msnm
		I020	N0 15.551 W78 08.801	3310 msnm
		I021	N0 15.551 W78 08.804	3313 msnm
		I024	N0 15.531 W78 08.810	3312 msnm
		I026	N0 15.547 W78 08.802	3314 msnm
		I022	N0 15.550 W78 08.806	3312 msnm
		I023	N0 15.543 W78 08.822	3325 msnm
	Lago San Pablo-Faldas del Imbabura	I001	N0 14.021 W78 10.620	3413 msnm
		I002	N0 14.022 W78 10.618	3412 msnm
		I006	N0 14.029 W78 10.612	3426 msnm
	Alrededores Laguna de Mojanda	P026	N0 05.447 W78 14.683	3596 msnm
		P028	N0 05.461 W78 14.703	3603 msnm
		P030	N0 05.477 W78 14.740	3616 msnm
		P031	N0 05.482 W78 14.745	3616 msnm
		P035	N0 05.504 W78 14.766	3629 msnm
		P036	N0 05.547 W78 14.795	3637 msnm
		P039	N0 05.597 W78 14.806	3637 msnm
Región 2	Parque Nacional Ilinizas	P013	S0 36.295 W78 41.004	3664 msnm
		P014	S0 36.560 W78 41.123	3707 msnm
		P015	S0 36.565 W78 41.118	3706 msnm
		P016	S0 36.574 W78 41.125	3705 msnm
		P017	S0 36.577 W78 41.126	3704 msnm
		P018	S0 36.572 W78 41.141	3704 msnm
		P019	S0 36.581 W78 41.138	3708 msnm
		P022	S0 36.611 W78 41.153	3718 msnm
		P024	S0 36.635 W78 41.148	3728 msnm
	P025	S0 36.315 W78 41.020	3667 msnm	
Parque Nacional	P002	S0 33.825 W78 26.568	3695 msnm	

	Cotopaxi	P003	S0 33.828 W78 26.567	3696 msnm
	Entrada Norte	P004	S0 33.832 W78 26.559	3698 msnm
		P008	S0 33.850 W78 26.560	3697 msnm
		P009	S0 33.855 W78 26.559	3696 msnm
		P011	S0 33.872 W78 26.553	3696 msnm
		P012	S0 33.896 W78 26.510	3701 msnm
	Parque Nacional	C001	S0 38.989 W78 30.600	3576 msnm
	Cotopaxi	C002	S0 38.995 W78 30.595	3582 msnm
	Entrada Sur	C005	S0 38.994 W78 30.574	3588 msnm
		C008	S0 38.978 W78 30.543	3592 msnm
		C009	S0 38.958 W78 30.531	3582 msnm
		C010	S0 38.951 W78 30.579	3583 msnm
		C019	S0 47.429 W78 56.027	3534 msnm
		C020	S0 47.439 W78 56.022	3538 msnm
		C021	S0 47.441 W78 56.025	3539 msnm
	Chugchilán, vía Sigchos	C022	S0 47.446 W78 56.028	3543 msnm
		C024	S0 47.444 W78 56.038	3549 msnm
		C026	S0 47.440 W78 56.048	3559 msnm
		C027	S0 47.435 W78 56.052	3562 msnm
		C034	S0 59.949 W78 55.612	4092 msnm
	Quilotoa, vía La Maná	C038	S0 59.975 W78 55.610	4096 msnm
		C045	S0 59.943 W78 55.613	4087 msnm

Región 3