

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Diversidad Genética de la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla
Isabela

Proyecto de Investigación

Analía Valeria Espín Oñate

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 16 de julio de 2018

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

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Diversidad Genética de la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla Isabela

Analía Valeria Espín Oñate

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 16 de julio de 2018

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:

Analía Valeria Espín Oñate

Código:

00117988

Cédula de Identidad:

1804132734

Lugar y fecha:

Quito, 16 de julio de 2018

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres que son el motor de mi vida. Sin ellos nada de esto hubiese sido posible. Gracias por enseñarme a luchar por mis sueños, a no rendirme, por inculcarme el valor de la responsabilidad y sobre todo gracias por nunca dejarme sola.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis padres porque han hecho un gran esfuerzo para que yo salga adelante siempre. Gracias por estar conmigo en los buenos y malos momentos. Sin ustedes mis sueños jamás se hubiesen cumplido. De corazón un infinito GRACIAS.

A María de Lourdes Torres por haber depositado su confianza en mí y darme esta gran oportunidad de realizar este trabajo de investigación, gracias por todas sus enseñanzas.

Agradezco al Parque Nacional Galápagos y al Galápagos Science Center por permitir la apertura y colaboración en este proyecto.

Al GAIAS Grant 2016 por haber financiado este proyecto.

Agradezco a todas las personas que forman parte del Laboratorio de Biotecnología Vegetal que se convirtieron en mis grandes amigos, gracias por todo su apoyo.

A Gabriela y María José Pozo que me guiaron durante toda esta investigación. Gracias por sus consejos y enseñanzas.

A Diego Urquía quien fue una guía muy importante durante toda la realización de mi proyecto.

A Carolina Cazco, Sofia Donoso y Pamela Borja que demostraron ser grandes amigas y personas increíbles. Gracias por apoyarme en todo momento durante toda mi carrera universitaria.

A mis amigas de toda la vida: Marcela, María José y Emily por estar en mis momentos de alegría y tristeza. Por darme ánimos para continuar sin rendirme.

RESUMEN

Las especies invasoras son una potencial amenaza para ecosistemas por su capacidad de reproducirse, extenderse, persistir en el tiempo y el posible desplazamiento de especies endémicas que podría ocasionar su extinción. La guayaba (*Psidium guajava*) es un ejemplo de una planta invasora de las Islas Galápagos. La guayaba está presente en cuatro islas: Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Fernandina, posiblemente afectando a especies nativas, entre ellas a su congénere endémico *P. galapageium* (guayabillo). Para entender el efecto de la introducción de la guayaba en Galápagos es importante conocer su diversidad genética. En estudios anteriores se analizó la diversidad genética de la guayaba en las islas San Cristóbal y Santa Cruz, donde se evidenció una baja diversidad genética ($H_e=0,326$ y $H_e=0,362$ respectivamente). El objetivo de este estudio fue conocer la diversidad genética y estructura poblacional de *Psidium guajava* (guayaba) en la isla Isabela usando marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs). Para ello, se analizaron 95 muestras provenientes de 16 localidades de la isla utilizando 13 pares de primers homólogos. De los 13 loci, 11 fueron polimórficos y se encontró un total de 40 alelos en toda la población. Los resultados muestran una diversidad genética baja ($H_e=0.284$). Por otro lado, no se observó una estructura poblacional definida. Las distancias genéticas (F_{st}) obtenidas entre localidades muestran diferenciación genética baja, lo cual sugiere un alto flujo génico entre individuos. Esto podría deberse a la fácil dispersión de la guayaba y a actividades humanas que contribuyen al desplazamiento de la planta. Los resultados encontrados coinciden con los obtenidos en San Cristóbal y Santa Cruz, y los tres estudios nos permiten entender de mejor manera el estado de la guayaba en las Islas Galápagos y su posible impacto sobre el guayabillo. La historia de la colonización de las islas y los resultados obtenidos en STRUCTURE sugieren que la población de Isabela y San Cristóbal son dos grupos diferentes, mientras que Santa Cruz tiene la contribución de las dos poblaciones con un aporte mayor de San Cristóbal.

Palabras clave: diversidad genética, ecosistema insular, especie invasora, marcadores microsatélites, *Psidium guajava*.

ABSTRACT

Invasive species are a potential threat to ecosystems because of their ability to reproduce, spread, and persist over time and the possible displacement of endemic species. Guava (*Psidium guajava*) is an example of an invasive plant of the Galapagos Islands. Guava is present on four islands, possibly affecting native species, among them its endemic congener *P. galapageium* (guayabillo). To understand the effect of the introduction of guava in the Galapagos, it is important to understand its genetic diversity. In previous studies, the genetic diversity of guava was analyzed in San Cristobal and Santa Cruz islands, where a low genetic diversity was evidenced ($H_e = 0.326$ and $H_e = 0.362$ respectively). The objective of this study was to determine the genetic diversity and population structure of *Psidium guajava* (guava) on Isabela Island using microsatellite-type molecular markers (SSRs). For this purpose, 95 samples from 16 localities of the island were analyzed using 13 pairs of homologous primers. Of the 13 loci, 11 were polymorphic and 40 alleles were found throughout the population. The results show a low genetic diversity ($H_e = 0.284$). On the other hand, a defined population structure was not observed. The genetic distances (F_{st}) obtained between localities show low genetic differentiation, which suggests a high gene flow between individuals. This could be due to the easy dispersion of guava and to human activities that contribute to the displacement of the plant. The results coincide with those obtained in San Cristobal and Santa Cruz islands, and the three studies allow us to better understand the state of guava in the Galapagos Islands and its possible impact on guayabillo. The history of the colonization of the islands and the results obtained in STRUCTURE suggest that the population of Isabela and San Cristobal are two different groups, while both contribute to the Santa Cruz population, San Cristobal to a higher degree.

Key words: genetic diversity, insular ecosystem, invasive species, microsatellite markers, *Psidium guajava*.

TABLA DE CONTENIDO

Derechos de autor	3
Dedicatoria	4
Agradecimientos.....	5
Resumen.....	6
Abstract	7
Tabla de Contenido.....	8
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras.....	12
Anexos	13
1. Introducción.....	14
1.1 Ecosistemas Insulares	14
1.2 Las Islas Galápagos.....	15
1.2.1 Área de Estudio: Isla Isabela.....	16
1.3 Especies Invasoras en Islas	17
1.4 Especie en Estudio: <i>Psidium guajava</i>	18
1.4.1 <i>Psidium guajava</i> como Especie Invasora	19
1.5 Estudio de la Diversidad Genética	20
1.5.1 Diversidad genética en islas	22
1.5.2 Diversidad genética en plantas invasoras.....	23
1.6 Marcadores Moleculares	24
1.6.1 Marcadores SSRs.....	24
2. Objetivos.....	26
2.1 Objetivo General	26
2.2 Objetivos Específicos.....	26
3. Área de Estudio	26
4. Justificación.....	27
5. Materiales.....	28
5.1 Material Vegetal.....	28
5.2 Extracción de ADN de las hojas	28
5.3 Cuantificación y Dilución de ADN de Guayaba.....	28
5.4 Electroforesis en gel de Agarosa	28
5.5 Amplificación de las regiones microsatélites SSR mediante PCR	29

5.6 Armado de placas.....	29
5.7 Análisis de datos	29
6. Métodos	31
6.1 Recolección de Muestras	31
6.2 Extracción de ADN	31
6.3 Cuantificación de las muestras de guayaba.....	31
6.4 Preparación de las muestras	32
6.5 Amplificación de los microsatélites por PCR.....	32
6.6 Genotipado de las muestras de Guayaba	33
6.7 Análisis de Datos	33
7. Resultados	35
7.2 Extracción y cuantificación de las muestras de <i>P. guajava</i>	35
7.3 Estandarización de Primers homólogos para guayaba.....	35
7.4 amplificación de los microsatélites por PCR y genotipado de las muestras de guayaba	35
7.5 Análisis de datos	36
7.5.1 Diversidad alélica	36
7.5.2 Diversidad genética.....	36
7.5.3 Diferenciación genética.....	37
7.5.4 Estructura poblacional	37
7.5.5 Nivel de parentesco y endogamia	38
7.5.6 Endogamia, efecto fundador, migración y flujo génico que influyen en la población de guayaba en la Isla Isabela.....	38
7.5.7 Comparación de la diversidad alélica y genética de la guayaba en la Isla Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal	39
7.5.8 Diferenciación genética en las 3 islas	39
7.5.9 Estructura poblacional en las 3 islas.....	39
8. Discusión.....	41
8.2 Diversidad alélica	41
8.3 Diversidad genética.....	41
8.4 Diferenciación genética	43
8.5 Estructura poblacional	44
8.6 Nivel de parentesco y endogamia	45
8.7 Endogamia, efecto fundador, migración y flujo génico que influyen en la población de guayaba en la Isla Isabela.....	46

8.8 Comparación de la diversidad alélica y genética de la guayaba en la Isla Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal	47
8.9 Diferenciación genética en las 3 islas	47
8.10 Estructura poblacional en las 3 islas	48
8.11 Historia de la colonización de las islas e introducción de <i>Psidium guajava</i>	48
8.12 Aporte del estudio de Diversidad Genética de <i>Psidium guajava</i> en la Isla Isabela: ¿Es posible el control de esta planta invasora?	50
9. Conclusiones	52
10. Recomendaciones	53
11. Bibliografía	54
12. Tablas	60
13. Figuras	67
14. Anexos	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: 11 pares de primers que resultaron ser polimórficos para <i>Psidium guajava</i> en Isabela. Se detalla la secuencia reverse, forward y los motivos.....	60
Tabla 2: Los 11 pares de marcadores SSRs con su respectivo fluoróforo, temperatura de annealing, el número de alelos encontrados por locus y el rango de tamaño para los alelos.....	60
Tabla 3: El número de alelos totales y privados obtenidos en las 16 localidades de la Isla Isabela.....	61
Tabla 4: Número de alelos totales y privados obtenidos en las 7 subpoblaciones formadas a partir de las 16 localidades en Isabela. Así como también el número de alelos y alelos privados corregidos por rarefacción.....	62
Tabla 5: H_o y H_e de las 16 localidades estudiadas en Isabela y así como los valores de H_o y H_e para toda la población.....	63
Tabla 6: H_o y H_e obtenidas para las 7 subpoblaciones en la Isla Isabela, así como el valor global para cada índice.....	64
Tabla 7: “ F_{st} pairwise” de las 7 subpoblaciones de guayaba en la Isla Isabela. El valor más alto se dio entre ETC y Zona Puerto Villamil (0,14) y el más bajo entre Los Mellizos con Fincas y Lím. Zona Agrícola (0,004).....	64
Tabla 8: Índices de Wang para evidenciar el nivel de parentesco y endogamia entre las subpoblaciones. Los Mellizos posee niveles de parentesco con ETC (0,196). Fincas y Lím. Zona Agrícola también está emparentada con ETC (0,035). Se vio que entre individuos de la subpoblación perteneciente a Los Mellizos (0,16) y en ETC (0,46) también hay parentesco.....	65
Tabla 9: Prueba realizada en BOTTLENECK demuestra un cuello de botella en la población de guayaba de la Isla Isabela a través del modelo SMM, ya que los valores en deficiencia de heterocigosidad (0,0105) y en la prueba de una cola (0,9919) son mayores que el valor p (0,05).....	65
Tabla 10: Número de alelos total y de alelos privados para Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal. Estos alelos fueron corregidos por rarefacción.....	66
Tabla 11: H_o y H_e para las 3 islas analizadas y los valores globales de los dos índices calculados.....	66
Tabla 12: “ F_{st} pairwise” calculado para las 3 islas con el fin de comparar y estimar si existe variación genética procedente de cada población.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Individuo GMA1 de *Psidium guajava* de la localidad del El Mango (Latitud: 0°52.348'S, Longitud: 91° 0.324'O) que formó parte del estudio de la Isla Isabela.....67
- Figura 2:** Área de muestreo en la Isla Isabela. Las 16 localidades ubicadas en el mapa, así como las 7 subpoblaciones formadas. 1. Círculo Rojo: Zona del Volcán: Volcán Sierra Negra y Volcán de Azufre, 2. Azul: El Cura, 3. Amarillo: Los Mellizos, 4. C.Morado: Zona Agrícola Centro: Ceibos, Cueva de Sucre y San Joaquín, 5. C. Verde: ETC: Esperanza, Los tintos y Cerro Grande, 6. C. Naranja: Fincas y Límite Zona Agrícola: F. Morocho, F. Ricardo García, Merceditas y Barrio Loja, 6. C. Azul: Zona Puerto Villamil: El Mango y El Ocho.....67
- Figura 3:** Análisis de Varianza Molecular para los individuos de guayaba en la Isla Isabela. La mayor contribución de la variación proviene de los individuos dentro de las subpoblaciones (62,44%).....68
- Figura 4:** Dendrograma de “Neighbor Joining” para las 7 subpoblaciones de guayaba en la Isla Isabela. Los individuos de ETC, Z. P. Villamil y El Cura al parecer poseen mayor distancia genética si se comparan con el resto de subpoblaciones.....68
- Figura 5:** PCoA para todos los individuos de guayaba en la Isla Isabela. Los individuos se encuentran mezclados entre sí, sin embargo se puede observar que posiblemente existan 3 agrupaciones.....69
- Figura 6:** Los resultados obtenidos en STRUCTURE demostraron la contribución de dos linajes (en morado y verde) para todos los individuos en Isabela. El linaje que mayor aporta a la población está en color verde. La presencia de dos linajes aporta con la diferenciación genética presente entre las muestras analizadas.....69
- Figura 7:** La mayoría de se encuentran en una distribución parecida a la normal, con valores F promedio entre 0,3 a 0,6. Pero existe un cambio abrupto en la distribución debido a la presencia de individuos con valores F promedio entre 0,7 y 0,8 (altas tasas de endogamia).....70
- Figura 8:** Análisis de Varianza Molecular realizado para las 3 islas (Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal) para determinar de dónde proviene la variación genética, en este caso se encuentra dentro de cada isla (45,37%).....70
- Figura 9:** El dendrograma realizado para las poblaciones de las 3 islas determinó que los individuos de la Isla Isabela poseen la mayor distancia genética.....71
- Figura 10:** El PCoA muestra la separación de los individuos de acuerdo a su ubicación geográfica. Los individuos de Isabela (ISA) y San Cristóbal (SCY) se encuentran totalmente separados, mientras que los individuos de Santa Cruz (SCZ) se encuentran entre las dos poblaciones mencionadas.....71
- Figura 11:** Análisis en STRUCTURE de las poblaciones de cada isla. Las poblaciones de San Cristóbal e Isabela pertenecen a grupos diferentes, mientras que la población de Santa Cruz posee la contribución de los dos linajes con un mayor aporte de San Cristóbal.....72

ANEXOS

- Anexo 1:** 95 individuos muestreados en 16 localidades de la Isla Isabela. Cada muestra posee su código, latitud, longitud y altura.....74
- Anexo 2:** Electroforesis en geles de agarosa al 1,5% para observar la amplificación de bandas de acuerdo al tamaño esperado por locus. Se puede observar la amplificación de los primers Cir08, cir07 y Cir09 con muestras de guayaba pertenecientes a diferentes localidades de Isabela.....75
- Anexo 3:** Genotipado de la muestra GCE3 en GenMarker con el primer Cir07 con fluoróforo VIC con un tamaño esperado de 156 pb.....75
- Anexo 4: Anexo 4:** Matriz de genotipado de los 95 individuos analizados en el estudio. Se presentan los alelos encontrados para cada par de primer (11 loci).....76
- Anexo 5:** Cuantificación de las muestras de *P. guajava* de la Isla Isabela.....78

1. Introducción

1.1 Ecosistemas insulares

Los ecosistemas insulares son prolongaciones de la corteza continental ubicadas en el mar. Su origen tiene que ver con los movimientos de las placas tectónicas y con actividad volcánica submarina. Son capaces de formar montañas conocidas como dorsales oceánicas y por acumulación de restos de corales, y de animales marinos muertos que forman rocas que constituyen la base de las islas luego de miles de millones de años (Rue, 1959). Las islas son fragmentos de hábitat natural donde las especies se han establecido y evolucionado en comunidades separadas del continente. Este ecosistema contiene organismos procedentes del continente y también propios de la isla, lo que constituye una biota diversa que puede ser única en el planeta, siendo de importancia crítica para la biodiversidad (Lara, s.f).

Las islas se caracterizan por tener una biodiversidad alta, en ciertos archipiélagos los habitantes dependen económicamente de estas especies. A nivel mundial los ecosistemas insulares son frágiles, se ha estimado que un 75% de especies animales (la mayoría aves) se extinguieron en el siglo XVII. Actualmente el 11% de las especies insulares están en peligro de extinción. Las principales causas por las cuales los organismos en islas desaparecen son por cambios climáticos, por una variabilidad en los químicos del agua de mar, por la elevación observada y proyectada del nivel del mar y la frecuencia con la que ocurre, también se debe a la intensidad de las tormentas, la reducción en precipitaciones en ciertas regiones y por el incremento de las temperaturas (INSULA, 2005).

La introducción de especies por los seres humanos a ecosistemas insulares provoca cambios negativos en este ambiente. Las especies que son consideradas invasoras en islas son aquellas que tienen la capacidad de expandirse más que las especies nativas, causando daños económicos o daños en el ecosistema (Traveset & Santamaría, 2004). Los ecosistemas insulares son más vulnerables, ya que las especies endémicas no tienen mecanismos de defensa contra las especies provenientes de otros lugares porque no hubo una coevolución. Algunos resultados de la introducción de especies invasoras son: extinciones en tiempos cortos por la competencia, degradación de los ambientes, alteración de los procesos y funciones ecológicas, modificación de los ciclos biogeoquímicos y afectación de la calidad del agua (Grupo de ecología y conservación de islas A.C, 2011).

1.2 Las islas Galápagos

Las islas Galápagos se encuentran en el mar a 966 kilómetros de la costa del Ecuador, fueron descubiertas el 10 de marzo de 1535. Desde el siglo 16 al 18 eran un refugio para piratas, y también funcionaban como un centro ballenero. La biodiversidad de este ecosistema fue descubierta con la visita de Charles Darwin en el año 1835. Este científico realizó investigaciones en el archipiélago, se dedicó al estudio de los pinzones del lugar y se dio cuenta que la forma de su pico cambiaba en cada especie dependiendo del lugar en el cual habitaban. La información recopilada sirvió de base para el desarrollo de su proyecto más grande, el libro denominado “El Origen de las Especies” (Tobar, 2001).

Las islas cuentan con una riqueza enorme de fauna y flora que no se encuentra en otro lugar. Es un ecosistema que debe cuidarse para evitar la pérdida tanto de especies animales como vegetales (Ministerio del Ambiente, 2018). La llegada del hombre y la domesticación de animales han afectado al archipiélago causando la desaparición de organismos. De acuerdo con la Dirección del Parque Nacional Galápagos, se han extinto especies de plantas, tortugas y mamíferos (Paucar, 2014). En estas islas existen alrededor de 3450 especies descritas, sin embargo no se ha descrito toda la biodiversidad (MICSE, 2013).

La distribución de las especies depende de las características biogeográficas y del clima en cada área. Existen más de 10.000 especies de animales en el archipiélago, entre organismos endémicos e introducidos distribuidos en la zona litoral, árida, de transición y húmeda (Izurieta, 2014). Por otro lado, la flora de las islas se divide en plantas endémicas, nativas, introducidas-cultivadas y las introducidas-no cultivadas. De acuerdo con datos reportados en el año 2013 en las Islas Galápagos se han encontrado aproximadamente 1581 especies de plantas vasculares. Adicional a esta información, el estudio de plantas propias en el archipiélago demuestran que 560 especies son nativas, de las cuales 180 son endémicas (Jaramillo & et.al., 2017).

La conservación de las especies permite la protección y mantenimiento de los ecosistemas marinos y costeros para que los procesos evolutivos y ecológicos sigan dándose a través del tiempo. Esto se complementa con la protección de los ambientes terrestres, de las comunidades, de las especies de flora y fauna dependientes de los ambientes marinos para sobrevivir. Se trata de preservar a los organismos endémicos, vulnerables, de importancia por su valor genético, ecológico, turístico o intrínseco y se promueve la recuperación de las poblaciones. Esto puede lograrse mediante sistemas de manejo adaptativo y participativo que aseguren la protección ambiental y la conservación de los recursos naturales (Parque Nacional de Galápagos, 1998).

Los proyectos de conservación en las Galápagos se dan para proteger el patrimonio natural tomando en cuenta criterios técnicos, científicos y de desarrollo sostenible. La ratificación de esto se da en la Constitución del Ecuador para el cuidado de la biodiversidad del archipiélago (Ministerio del Ambiente, 2018). Para preservar este ambiente, se permite que exista población humana únicamente en las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana. Además se creó el Parque Nacional Galápagos y la Fundación Charles Darwin en el año 1959 para la preservación de los ecosistemas. La UNESCO lo declaró Patrimonio Natural de la Humanidad en el año 1979, por ser considerado un paraje único en el mundo (Tobar, 2001).

1.2.1 Área de estudio: Isla Isabela

La isla Isabela es la más grande del archipiélago, su formación se debe a 5 volcanes en actividad, como es el caso de Wolf que viene a ser el punto más alto de todas las Galápagos. Hay evidencia de la existencia de un sexto volcán inactivo del cual solo existen restos, por lo que se estima que en siglos pasados ocurrió un desastre natural que acabó con la isla. El área de Isabela (4588 km²) equivale al 60% de toda la superficie del archipiélago, está ubicada entre las islas Fernandina y Santiago. Es una de las cuatro islas que está poblada. La población humana se ha asentado en Puerto Villamil en la zona Sur de Isabela y se dedica a la agricultura, la pesca y al turismo. (Rengifo, 2011).

La vegetación en la Isla Isabela está dividida en diferentes zonas, dependiendo del lugar geográfico en el que se encuentra. La isla posee zona costera, z. árida, z. de transición, z. *Scalesia*, z. marrón, z. de *Miconia* y pampa zona. La zona costera permanece siempre verde y la plantas poseen resistencia a la salinidad, a su vez esta zona se subdivide en manglar y seca. La zona árida tiene bosques semi-desérticos formados por árboles y arbustos caducifolios, hay cactus y líquenes. En la zona de transición existen árboles de *Scalesia pedunculata*, esta área es usada para fines agrícolas y ganaderos. La zona marrón es el intermedio entre *Scalesia* y *Miconia*, los bosques son abiertos dominados por la planta llamada uña de gato, también abundan las epifitas, musgos, hepáticas y helechos. La zona de *Miconia* está dominada por arbustos con el mismo nombre, hay gran cantidad de helechos y hepáticas. Finalmente las pampas se caracterizan por poseer helechos, hierbas y juncos (Galapagos Conservancy, 2018). De acuerdo con estudios se determinó que la mayoría de plantas son vasculares (261 especies). El 82% de las especies descritas pertenecen a plantas introducidas, de las cuales un 50% son ornamentales, 22% usadas para comida, un 5% como medicinales y 5% tienen varios usos centradas principalmente en Puerto Villamil (Aldaz, 2008). En los últimos años este ecosistema

ha sufrido cambios por las especies invasoras y se ha visto la necesidad de generar planes de erradicación para conservar tanto a los animales como a las plantas propias de la zona (MICSE, 2013).

1.3 Especies invasoras en islas

Una invasión biológica se da cuando una especie es transportada a una nueva área donde tienen la capacidad de reproducirse, extenderse y persistir en el tiempo. El transporte de especies a un lugar en el cual no se encuentran naturalmente ha aumentado exponencialmente y es así que hay especies invasoras en casi todos los ecosistemas del mundo. El movimiento a nuevos lugares se da por diferentes motivos relacionados con valor económico, ornamental o incluso para actuar como agentes de control biológico o de restauración de un ambiente (Schüttler & Karez, 2009).

Las especies que habitan en islas no poseen las mismas presiones selectivas que otras especies, por ejemplo el pastoreo por herbívoros o por la presencia de depredadores. Por esta razón una invasión biológica en una isla se da fácilmente. Las islas se vuelven ecosistemas vulnerables cuando ocurren invasiones, siendo el ser humano el principal causante de la introducción de especies durante eventos de migración. Los efectos que causan las invasiones no son predecibles y su detección se da cuando el organismo ya se estableció, es decir cuando ya es demasiado tarde para tratar el problema en la fase inicial, fase en la cual la invasora aún se está adaptando a nuevas condiciones de vida y el número de individuos es bajo (MICSE, 2013).

Cuando las invasiones ocurren las consecuencias son daños a la biodiversidad, pérdidas económicas, problemas sanitarios, entre otros (Grupo de ecología y conservación de islas A.C, 2011). El disturbio en las islas provoca una alteración de los ciclos biogeoquímicos y en la estructura de los niveles tróficos. Son competidores para las especies endémicas, algunos son depredadores, parásitos y también suelen ser patógenos. Esto provoca una disminución en la supervivencia de las especies nativas, hay un aumento en la vulnerabilidad de los organismos y las poblaciones endémicas decrecen (Aguirre & Mendoza, 2009). En el archipiélago de Galápagos la introducción de plantas y animales ha ocurrido a partir del siglo XIX cuando los primeros colonizadores pisaron estas tierras. Las especies introducidas han logrado colonizar este territorio gracias a las actividades del hombre. La presencia de organismos invasores ha traído efectos negativos en el archipiélago como la alteración de características ecológicas,

cambios en las propiedades físicas de los ecosistemas, afectación al ciclo de nutrientes y en la productividad vegetal (Mack & et.al., 2000).

Se han caracterizado alrededor de 1260 especies de plantas en las Galápagos, de las cuales 180 son endémicas (MICSE, 2013). Estas plantas evolucionaron hace 3 millones de años con una tasa de generación de una por cada 10.000 años. Se calcula que 750 plantas vasculares fueron introducidas por el ser humano y el 90% de ellas se dio de manera provocada, esto significa que 1,6 plantas por año se establecieron en las islas. El 90% son plantas útiles para las personas como las hortalizas, frutales, maderables, plantas medicinales y las ornamentales (MICSE, 2013).

La cascarilla, mora y guayaba son ejemplos de especies invasoras capaces de crecer en zonas donde no existían árboles, arbustos o trepadoras. Las herbáceas y pastizales se han adueñado de zonas con vegetación endémica. El problema es muy grave en las zonas altas-húmedas prístinas, ya que hay cambios ecológicos que contribuye con la disminución de poblaciones a ritmo acelerado y causan problemas económicos a los agricultores (MICSE, 2013).

Las invasiones son difíciles de controlar y erradicar y cada invasión depende de la biología de la especie invasora, de su capacidad de adaptación y de las características del ecosistema que ha sido invadido. Un factor que dificulta el control o erradicación de invasiones de plantas es cuando hay dispersores como animales herbívoros involucrados, además depende de la biología de la especie invasora, de su capacidad de adaptación y de las características del ecosistema que ha sido invadido. La presencia de especies introducidas hace que las especies endémicas no tengan suficiente espacio para crecer y hay una competencia por los nutrientes. Debido a todos los efectos negativos, se está tratando de eliminar las especies introducidas para recuperar bosques de plantas únicas de las Galápagos mediante planes de conservación (Rentería, Gardener, Panetta, Atkinson, & Crawly, 2012).

1.4 Especie en estudio: *Psidium guajava*

La guayaba (*Psidium guajava*) (Figura 1) es una especie frutal en forma de arbusto de color verdoso perteneciente a la familia Myrtaceae. Es un árbol frondoso con una altura aproximada de 5-6 metros en promedio, su tronco tiene un color verdoso- carmelita y está cubierto de una cáscara escamosa. Tiene hojas elípticas, opuestas a las flores, los frutos son bayas de 9 cm globoides y carnosos de sabor dulce (Castaño & Montes, 2014). Tiene un cáliz persistente color rosado-amarillento, un olor fragante, cáscara amarilla y el fruto posee varias semillas redondas

de 3 a 5 mm. Tiene una raíz radial y superficial, las plantas son hermafroditas y existen cultivares naturales y artificiales. Esta planta se encuentra en México, Centroamérica, Sudamérica, Brasil, Perú, Venezuela, Colombia, Las Antillas y el sur de Florida. Siglos atrás fue transportada hacia India, Asia y África. Su desarrollo se da en más de 50 países de clima tropical (CONABIO, s.f). El origen de esta planta es incierto pero ha sido ubicada en Mesoamérica, la propagación fue realizada por los españoles y los portugueses hacia los trópicos donde se naturalizó con la ayuda de aves (CONABIO, s.f).

El fruto de la guayaba es conocido en todo el mundo y la producción mundial es de alrededor de 1,2 millones de toneladas por año, siendo India y Pakistán los mayores productores con un 50% de la producción mundial, seguido por México con un 25% y el resto corresponde principalmente a Colombia, Egipto y Brasil (Pérez & et.al., 2015). La producción inicia a los 4 años de su germinación y termina cuando la planta tiene un promedio de vida de 15 años. La cosecha se da cuando el fruto tiene un color verde-amarillento (Yam Tzec, Villaseñor, & Soto, 2010). Uno de los usos más importantes del fruto de la guayaba es la alimentación, pero también se utiliza a la planta para obtener madera y combustible, extracción de colorante de las hojas, como curtiente, como alimento para animales y como insecticida. La flor es melífera y también es considerada medicinal. A pesar de ser ventajosa en ciertas zonas y áreas de diversos países, también se la considera como invasora debido a su alta y rápida propagación. Puede reducir el desarrollo de otras especies, es capaz de colonizar sitios abiertos y adueñarse de bosques nativos. Los lugares más afectados han sido Hawái, Galápagos, Zimbabue, Australia y Nueva Zelanda (CONABIO, s.f).

1.4.1 *Psidium guajava* como especie invasora

De acuerdo con datos históricos la guayaba fue introducida en las islas Galápagos desde el Ecuador continental en 1850 aproximadamente. Gracias a estrategias de adaptación y supervivencia, la planta es considerada invasora (Key, 2004). Las áreas donde crecen plantas endémicas como el guayabillo, bosque lechoso, palo santo, matazarno, entre otros han sido reemplazadas por cultivos y zonas ganaderas donde ha crecido y se ha establecido la guayaba (Aldaz, 2008).

La guayaba es una planta invasora porque tiene tasas de propagación muy rápidas con una fácil dispersión en el suelo. Su propagación puede ser vegetativa o por regeneración de retoños (CONABIO, s.f). Los animales como las aves pueden diseminar las semillas en islas en espacios comprendidos por 1 hectárea aproximadamente. Esto depende del movimiento que

tienen estos pequeños vertebrados que comprenden distancias cortas (Borrel, Brown, & Slater, 2011). Megaherbívoros como las tortugas también están encargadas de la dispersión de semillas de la guayaba. A pesar de que se mueven lentamente pueden recorrer distancias de 3260 metros aproximadamente permitiendo la dispersión de la planta (Blake & et.al., 2012) Además el ser humano se encarga de su introducción a nuevas zonas de cultivo y desde ahí la guayaba ha logrado dispersarse y proliferar entre la flora silvestre (CONABIO, s.f).

La germinación puede darse bajo condiciones fisiológicas extremas, los principales vectores de diseminación de las semillas son las aves y mamíferos. Un estudio reciente en la guayaba mostró que es una gran competidora porque mediante la alelopatía, que es un fenómeno en el cual la planta afecta a otras mediante la liberación de sustancias bioquímicas, hace que la invasión pueda ser exitosa, gana territorio y desplaza a las especies nativas (Kawawa & et.al., 2016). La presencia de la guayaba ha causado problemas en el ecosistema de las Galápagos porque altera los paisajes, tapa la luz a otras especies, modifica el suelo y desplaza a los organismos vegetales nativos. Su congénere el guayabillo (*P. galapageium*) al parecer ha sido afectado por la presencia de la guayaba, ya que esta especie ha invadido zonas donde solo crecía esta planta, afectando a su desarrollo y crecimiento (Aldaz, 2008).

1.5 Estudio de la diversidad genética

La diversidad genética se refiere a las variaciones heredables que se dan en cada organismo, entre individuos de una población y entre poblaciones pertenecientes a una especie. Son el resultado de las diferencias que existen entre los alelos de un gen de los individuos de una especie (CONABIO, 2009)

La diversidad de los organismos vivos se debe a cambios en las secuencias de ADN y también depende de los factores ambientales. Esta variación genética es evidente en cada individuo perteneciente a cierta especie, ya que todos poseen diferencias en sus secuencias de ADN. Esto se da por mutaciones generando el reemplazo de un nucleótido por otro, también por inserciones o deleciones de fragmentos de ADN, o por una duplicación, o por la inversión de estos fragmentos (Universidad de los Andes, s.f). Las mutaciones pueden ser neutras si no hay cambios en el metabolismo o en el fenotipo, o pueden ocurrir variaciones funcionales. Las variaciones funcionales son cambios en los nucleótidos que afectan la composición de las proteínas generando otras funciones dentro de los procesos metabólicos, donde se puede generar un beneficio o la proteína puede perder la funcionalidad. Los cambios más importantes

son aquellos que tienen que ver con proteínas involucradas en el desarrollo de ciertos estados fisiológicos (Wong & et.al., 2003).

La variación genética permite que las especies evolucionen, entender todos los procesos involucrados es importante para generar planes de conservación y avances en genética evolutiva, en salud pública, productividad agrícola y en biomedicina (Piñero & et.al., 2008). La información que se obtenga del análisis genético de organismos puede servir para: hacer una evaluación de la capacidad de respuesta de las poblaciones y de las especies frente al cambio ambiental, que puede ser natural o provocado por el ser humano de manera consciente o inconsciente; conocer los riesgos de la pérdida de especies, de poblaciones y de los recursos genéticos que disminuyen la supervivencia de las poblaciones; saber la riqueza genética en un área específica y la distribución en el mapa geográfico; establecer estrategias de aprovechamiento y de conservación para poblaciones, especies y recursos genéticos; entender cuáles son las causas que conllevan a la pérdida de diversidad genética; y/o evaluar las consecuencias de la introducción de especies invasoras, variedades mejoradas, variedades modificadas genéticamente y plagas sobre poblaciones nativas (Piñero & et.al., 2008).

Para conservar la variabilidad genética se debe partir de conocimientos de estructura genética de las especies en investigación. Es importante conocer los patrones de distribución de esta variabilidad entre las distintas poblaciones de una especie determinada. Esto se logra a través de la aplicación de métodos de análisis y cuantificación de la diversidad. Para realizar estos estudios, el número de los individuos analizados debe ser representativo de la población a la que pertenece y los marcadores genéticos analizados deben ser lo suficientemente informativos como para realizar mapeo genético. La diversidad es analizada mediante el uso de marcadores (es una sustancia utilizada como un indicador o para la identificación de un proceso o suceso dentro de un organismo) morfológicos, citogenéticos, bioquímicos y moleculares (Elorrieta, 1993).

Los individuos de una especie no son iguales, siempre habrá diferencias en su forma, función y comportamiento. Las variaciones dentro de una especie permiten la evolución, los individuos que sobrevivan se reproducirán y transmitirán esto a su progenie (CONABIO, 2009). Los beneficios que trae tener una mayor variación genética son altos índices de supervivencia o tasas de crecimiento relativamente superiores. La resistencia a perturbaciones en el ambiente es mayor durante el desarrollo de los organismos. Las poblaciones

genéticamente variables poseen características que les brindan una ventaja sobre poblaciones con menor variación génica que afecta a su adaptabilidad (Elorrieta, 1993).

1.5.1 Diversidad genética en islas

Los ecosistemas insulares son considerados espacios geográficos pequeños que pueden poseer una alta cantidad de fauna y flora. Tienen una elevada proporción de taxones endémicos por lo que la preservación de la diversidad genética y la prevención de la extinción de especies son importantes (Bramwell & Pérez, 1982). Investigaciones sugieren que las especies endémicas en islas mantienen un nivel bajo de diversidad genética y una alta diferenciación genética entre poblaciones. En ciertos casos la diversidad genética puede variar entre poblaciones pertenecientes a islas que se encuentran cercanas entre sí, esto puede depender del origen de los individuos colonizadores, ya que puede ser continental o de otras islas. Los patrones de colonización e introducción de plantas dependen de la distribución de la población humana, de sus actividades y el tiempo de migración en cada isla (Maki, Yamashiro, & Matsumura, 2003).

La variación genética en las islas se ve determinada por los efectos de la pérdida de diversidad durante un evento de fundación, por inmigraciones secundarias y por procesos de mutación. La selección natural también provoca la pérdida de variación ya que los alelos favorables afectan a la proporción de heterocigotos. Además eventos como un cuello de botella disminuyen significativamente el número de heterocigotos hasta en un 25% en una población, por lo tanto se reduce la variación de alelos para un gen (Frankham, 1997).

La diversidad genética cuantitativa se correlaciona con el número de heterocigotos dentro de la población y la supervivencia de la misma (a mayor heterocigotos más probabilidad de sobrevivir). El equilibrio en la frecuencia de los alelos es importante para mantener un número adecuado de individuos con el pasar del tiempo. En las islas la diversidad es baja, dificultando que las especies perduren de generación en generación (Frankham, 1997). La preservación de especies silvestres que se relacionan con plantas cultivadas y con especies útiles para el ser humano se lograría mediante preservación *in situ* y con la creación de bancos de germoplasma (Bramwell & Pérez, 1982).

1.5.2 Diversidad genética en plantas invasoras

Las especies invasoras son reconocidas como una amenaza para la biodiversidad, y son una preocupación particular para los ecosistemas con especies endémicas. La distribución y los factores por los cuales ciertas especies logran invadir nuevos entornos aún no se conocen del todo, por lo que saber su biología es importante para su erradicación (Tsutsui, Suarez, Holway, & Case, 2000). Las especies invasoras tienen esta capacidad debido a que tuvieron un proceso de evolución relativamente rápido. Esto hizo que las poblaciones sean genéticamente dinámicas en el espacio y el tiempo. Las características genéticas dentro de las poblaciones impactan la capacidad de expansión. La selección natural y la deriva génica alteran la estructura genética de las especies invasoras modificando la tolerancia que poseen y el comportamiento en el nuevo entorno en el que se desarrollan e inducen cambios evolutivos en las especies endémicas (Eunmi, 2002).

El éxito de la invasión se da por la varianza genética aditiva (son los efectos aditivos de los genes sobre el fenotipo) que influye directamente sobre el fenotipo y es la causa principal del parecido entre parientes, esto determina el nivel de heredabilidad en la población y la respuesta positiva a la selección mediante epistasis, que es la expresión de uno o más genes que dependen de la expresión de otro gen. Además puede darse una interacción entre lo genético y ambiental, donde los genotipos cambian si se pasa de un ambiente a otro (Moreno & et.al., 2002). La hibridación también ayuda a la invasión porque especies emparentadas pueden generar nuevos individuos por compensaciones genéticas para obtener un número de genes equivalentes en hembras y machos cuando el número de cromosomas es diferente entre los dos sexos (Sánchez, 2006). Otro factor involucrado en procesos de invasión es la acción de un número pequeño de genes y posiblemente un rearrreglo genético mediante traslocaciones, que es una reubicación de genes en los cromosomas (Salamanca, 2007).

La selección natural y la deriva génica promueven el desarrollo de las especies invasoras (en ciertos casos) porque mediante reproducción diferencial las frecuencias alélicas cambian de generación en generación favoreciendo al establecimiento en ecosistemas que normalmente no son favorables para su desarrollo, pero los eventos más importantes que deben darse son: selección fuerte y cambios hereditarios porque están involucrados con la tolerancia al invadir nuevos hábitats (incluye cambios fisiológicos) logrando adaptarse y crecer exponencialmente (Eunmi, 2002).

1.6 Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son segmentos de ADN ubicados en un lugar específico del genoma y cuya herencia genética puede ser rastreada. Pueden ser genes o porciones de genoma que tienen una función conocida o desconocida. Su uso es para “marcar” el comportamiento de un gen o de la herencia de un carácter específico (Universidad de los Andes, s.f).

Los marcadores moleculares son una herramienta importante en la biología en campos como la evolución, ecología, bio-medicina, estudios de diversidad y en las ciencias forenses. Sirven para ubicar y aislar material genético que es de interés en ciertas investigaciones. Con el uso de técnicas moleculares se puede conocer el número de genes dentro de una población indirectamente si se analizan las proteínas o un estudio directo cuando se utiliza el ADN. Los marcadores moleculares poseen la capacidad de identificar polimorfismos en un solo loci o en varios de ellos, estos pueden ser dominantes o co-dominantes (Rentería M. , 2000).

Los marcadores permiten determinar las características físico-químicas del ADN. La herencia es explicada bajo las leyes de la genética, con esto se puede saber la variabilidad genética y determinar las relaciones filogenéticas. Un uso de marcadores es el seguimiento de genes de interés, se puede aumentar la eficiencia en cuanto a la selección de plantas y de variedades para hacer mejoramiento genético y con esto se puede predecir los genotipos que se desea obtener al realizar un cruzamiento basado en la información obtenida de los parentales (conocimiento de sus rasgos más importantes). Igualmente, los marcadores, sirven para la identificación de plantas por separado que poseen alelos de interés, se puede caracterizar genes específicos encargados de ciertas funciones que le brindan adaptabilidad o ventaja frente otros seres vivos (Rocha, 2003).

1.6.1 Marcadores SSRs

Los marcadores SSRs (Secuencias Simples Repetidas) o microsatélites son secuencias de ADN que están formadas por 1 a 4 pares de bases. Son unidades cortas repetidas o también denominadas motivos básicos en tándem en un alto número. Estos loci están en regiones codificantes y no codificantes del ADN. Son neutros, codominantes con una alta tasa de mutación, haciéndolos polimórficos con un valor mayor al 90%. Los SSRs han sido identificados en varias plantas y animales. Se los usa para estudios de variación genética intraespecífica e interespecífica y para el estudio de linajes y de sistemas reproductivos

(Rentería M. , 2000). Los SSRs son abundantes dentro de los genomas de los eucariotas y también algunos procariotas (Picó & Esteras, 2010).

Las secuencias SSRs están definidas por el tipo de unidad que se repite y también por la localización en el genoma. Se ha determinado que son muy frecuentes en peces, insectos y en los mamíferos; en menor proporción están en las aves, los lepidópteros y las plantas. Poseen una alta variación que se evidencia en las diferencias de longitud entre los alelos pertenecientes al mismo locus, las diferencias en la longitud se debe a que hay un número diferente de repeticiones del motivo de cada individuo. Tiene una tasa de mutación 10^{-2} y 10^{-5} representando un alto polimorfismo relacionado con los errores producidos durante el deslizamiento de la enzima polimerasa durante la replicación de una región específica (Picó & Esteras, 2010).

Estos marcadores genéticos presentan altas tasas de mutación, sin embargo sus regiones flanqueantes se encuentran conservadas por lo que sirven para la amplificación específica de una determinada región. Se utiliza a los marcadores SSRs para realizar pruebas de paternidad, en genética forense, análisis de poblaciones, estudios de diversidad y la identificación de varietales, construcción de mapas genéticos y estudios de asociación. Es una técnica molecular que ha ido ganando terreno con el pasar del tiempo y que va de la mano de las genotecas genómicas (colección de fragmentos de ADN superpuestos que sirven para la clonación de un vector que se induce en una célula huésped) de especies que sirve para aislar secuencias y genes que son la base para estudios moleculares, también para la conservación del genoma y estudios de secuenciación de ADN (Zerené, 2002).

Para este proyecto de investigación se usaron 13 pares de primers homólogos específicos para las regiones microsátélites de *Psidium guajava* (Kanupriya, et.al; 2011) considerada invasora en Galápagos, con el fin de analizar la diversidad genética y la estructura poblacional de esta especie en la Isla Isabela. Los resultados encontrados en este estudio ayudarán a entender cómo *Psidium guajava* logró establecerse e invadir zonas no cultivadas en Isabela permitiendo relacionar los datos moleculares con la historia de colonización.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Determinar la diversidad genética y la estructura poblacional de la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla Isabela, Galápagos mediante el uso de 13 marcadores SSRs.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Analizar la diversidad genética de *Psidium guajava* en la isla Isabela de Galápagos.
- b. Determinar si existe estructura poblacional de *Psidium guajava* en la isla Isabela de Galápagos.
- c. Conocer cuáles son las fuerzas evolutivas como: endogamia, efecto fundador, migración y flujo génico que influyen en la población de *Psidium guajava* en la isla Isabela de Galápagos.
- d. Realizar una comparación de la diversidad genética de la guayaba entre las islas Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal.
- e. Analizar la estructura poblacional de *Psidium guajava* en la Isla Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal.

3. Área de estudio

Para la realización de este proyecto se usaron muestras de ADN extraídas de hojas de guayaba que fueron recolectadas de 16 localidades en la isla Isabela: Barrio Loja, El Mango, El Cura, Los Ceibos, Merceditas, Volcán Sierra Negra, Cerro Gato, Cueva de Sucre, Los Mellizos, El Ocho, Ricardo García, Los Tintos, Esperanza, San Joaquín, Finca Morocho y Volcán Azufre (Figura 2).

La extracción y cuantificación del ADN proveniente de las hojas recolectadas se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular perteneciente al “Galapagos Science Center” ubicado en Puerto Baquerizo Moreno. La dilución del ADN, amplificación de los marcadores microsatélites, genotipado y análisis de los datos obtenidos fue realizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, campus Cumbayá. La electroforesis capilar estuvo a cargo de MacroGen en Seúl, Corea.

4. Justificación

Las invasiones biológicas se dan cuando ocurre un transporte de ciertas especies a nuevas áreas donde tienen la capacidad de reproducirse, extenderse y persistir en el tiempo (Aguirre & Mendoza, 2009). Las actividades del hombre como el transporte, comercio o turismo han aumentado considerablemente la cantidad de especies exóticas con el pasar de los años, invadiendo ecosistemas y causando un desequilibrio de los mismos (Schüttler & Karez, 2009).

Las islas Galápagos poseen una gran cantidad de flora y fauna únicas en el mundo. Por esta razón se quiere evitar daños en los diferentes ecosistemas dentro del archipiélago causados principalmente por la presencia de población humana. Existe un alto porcentaje de organismos endémicos que han sido amenazados por la introducción de especies no nativas, causando la extinción de animales y plantas propias de las islas (MICSE, 2013).

La guayaba es considerada una especie invasora dentro de las islas que se ha tratado de controlar en los últimos años debido a que puede provocar alteraciones en el ecosistema y posiblemente está afectando a su congénere, el guayabillo (*Psidium galapageium*).

La isla Isabela posee el área más grande de todo el archipiélago de Galápagos, ocupando el 60% del mismo, ya que es una fusión de los 6 volcanes más grandes del lugar. La flora está compuesta de manglares y arbustos principalmente donde ha logrado proliferar la guayaba causando una perturbación en el ambiente lo que ha facilitado su germinación y supervivencia en zonas llamadas de Pampa y *Scalesia*. Se ha estimado que existe más de 40.000 hectáreas (ha) de esta planta afectando a las especies endémicas al reducir su desarrollo (Key, 2004).

El estudio de diversidad genética de la población de guayaba analizada en la Isla Isabela puede ser información útil que ayude a entender cómo la diversidad está relacionada con la adaptación y proliferación de especies vegetales invasoras en islas. En la actualidad es una problemática creciente que requiere de la aplicación de planes de protección, así como también la implementación de planes de conservación para las especies nativas. En base a los resultados obtenidos se espera conocer los patrones de dispersión de la guayaba en la isla debido a la presencia del ser humano, de sus actividades y de animales como aves y herbívoros que actúan como dispersores naturales (Rentería & Buddenhagen, 2007).

5. Materiales

5.1 Material Vegetal

Los 95 individuos del estudio fueron recolectados de 16 localidades pertenecientes a la isla Isabela. El número de individuos por zona varía y se tiene un mínimo de 2 muestras por lugar y un máximo de 12 (Anexo 1).

5.2 Extracción de ADN de las hojas

- Mortero y pistilo
- Hojas de las muestras de guayaba recolectadas
- Cama de arena Multi-Blok Heater (Thermo Scientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol 100% (Merck)
- Tris base 10 mM, EDTA 1 mM, pH: 8 (TE)
- Tubos Eppendorf 1,5 ml
- 2 β -mercaptoetanol (Bio-Rad)
- Etanol 70%

5.3 Cuantificación y dilución de ADN de guayaba

- ADN extraído de la guayaba
- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

5.4 Electroforesis en gel de agarosa

- Ultra Pure™ Agarose (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris-base ácido bórico- EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Ultra Pure™ Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- Cámara de electrophoresis Enduro Gel WL (Labnet International)

- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

5.5 Amplificación de las regiones microsatelites SSR mediante PCR

- 13 pares de primers SSR específicos para guayaba (Tabla 1)
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/ul (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50 mM (Invitrogen)
- Ultra Pure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- Cola universal A marcada con fluoróforos: FAM, PET, NED y VIC (Invitrogen)
- T100 Thermocycler (BIORAD)

5.6 Armado de placas

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

5.7 Análisis de datos

- Software GeneMarker® (SoftGenetics LLC, 2012)
- Software R-studio :
 - Paquete *adegenet*
 - Paquete *ape*
 - Paquete *pegas*
 - Paquete *ade4*
 - Paquete *diversity*
 - Paquete *hierfstat*
 - Paquete *ggplot2*
 - Paquete *ggfortify*
 - Paquete *cluster*
 - Paquete *devtools*
 - Paquete *poppr*
 - Paquete *ggord*
 - Paquete *pophelper*
- Software HP-RARE 1.0
- Software STRUCTURE 2.3.4:
 - Structure Harvester

- CLUMPP 1.1.2
- Software BOTTLENECK 1.2.02
- Software *Coancestry*
- Software *Arlequin 3.5*
- Software *ArcGis*
- Microsoft Excel[®]

6. Métodos

6.1 Recolección de muestras

La salida de campo se llevó a cabo en el mes de julio de 2016, se muestreó 95 individuos de *P. guajava* tomados de áreas accesibles a la recolección. Los individuos provienen de 16 localidades. Los árboles de los cuales se recolectaron las hojas (5 por individuo) estaban uno cerca del otro, no había una distancia considerable entre cada árbol, ya que el acceso de muestreo era difícil. Existía demasiada vegetación lo que impedía una recolección aleatoria de los individuos. Se intentó obtener un mínimo de 3 muestras por localidad, sin embargo en Cueva de Sucre y Ricardo García solo se logró obtener 2 muestras debido a la escasez de la planta. Las muestras fueron colocadas en hielo y transportadas hacia el “Galapagos Science Center” en San Cristóbal.

6.2 Extracción de ADN

Se extrajo el ADN de las hojas jóvenes recolectadas de acuerdo con el protocolo de Saghai-Marooif (1984). Se tomó 25 mg de la hoja, antes de la maceración el pistilo y el mortero fueron desinfectados con etanol al 70%, se procedió a la trituración del material vegetal. Se colocó el material macerado en tubo eppendorf de 1,5 ml para añadir CTAB y β -mercaptoetanol que ayudaron a la precipitación y desnaturalización de las proteínas del tejido vegetal. Se incubó en la cama de arena a 62°C por 1 h, con agitación cada 15 minutos. Terminado este tiempo se añadió cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se dejó reposar por 20 min y se centrifugó por 20 min a 13800 rpm. Esto separó las proteínas de los ácidos nucleicos en fase acuosa, se recuperó esa fase para transferirla en nuevos tubos eppendorf de 1,5 ml. Se añadió el alcohol isopropílico y se agitó, el ADN precipitó luego de centrifugar por 5 min a 5000 rpm. Se observó un pellet de ADN que se recuperó al descartar el sobrenadante, se lavó con etanol al 70%, se eliminó y se dejó secar en la cámara de flujo laminar. Como último paso el pellet de ADN se re suspendió en 50 μ l de TE y se conservó a una temperatura de -20°C.

6.3 Cuantificación de las muestras de guayaba

Las 95 muestras pertenecientes al estudio fueron cuantificadas utilizando espectrofotometría en NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

6.4 Preparación de las muestras

Una vez que las muestras fueron cuantificadas se procedió a realizar diluciones con una concentración de 20 ng/ul. Las muestras fueron conservadas a -20°C.

6.5 Amplificación de los microsatélites por PCR

Para la realización de las reacciones de PCR se usó 13 pares de primers que son específicos para la guayaba y que fueron descritos en el estudio de Kanupriya et.al., 2011, demostrando polimorfismos en investigaciones anteriores. Para la amplificación de las muestras se usó el protocolo de los 3 primers: el primer universal “forward” marcado con fluoróforo (VIC, PET, FAM o NED), el primer “forward” específico que ha sido modificado con una cola en su extremo 5' que es complementaria a la secuencia del primer universal y el primer “reverse” específico. En los primeros ciclos de la PCR el primer “forward” con la cola se acaba, ya que está en menor concentración, y para continuar con el proceso se incorpora el primer “forward” universal marcado con el fluoróforo permitiendo la identificación de los alelos cuando la fluorescencia es detectada (Blacket & et.al., 2012).

Se realizó una estandarización de los primers utilizando pocas muestras por localidad para establecer la temperatura de annealing y otras condiciones de PCR. Se realizó gradientes entre 50 a 65°C en un termociclador “T Professional Gradient Thermocycler”, luego los resultados fueron observados en geles de agarosa al 1,5%. Con esto se determinó la temperatura de annealing y otras condiciones de PCR para cada par de primers (Tabla 2).

Se amplificó las 95 muestras con 13 loci microsatélites. Las reacciones de PCR se colocaron en tubos eppendorf de 0,2 ml, el master mix se realizó a un volumen final de 30 ul. Se añadió 18, 55 ul de agua de PCR, 1X de buffer, 2 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,15 mM de primer forward + cola, 0,5 mM de primer reverse, 0,5 mM del fluoróforo (VIC, PET, NED o FAM), 1 U/ul de *Taq Platinum* con 3 ul de muestra diluida previamente a 20 ng/ul. Los primers tuvieron un fluoróforo designado para ser amplificado con el número total de muestras (Tabla 2).

El programa que se corrió para las muestras se realizó en termocicladores en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito que contenía los siguientes pasos: 1. denaturación inicial a 95°C por 15min, 2. denaturación a 94°C por 30 segundos, 3. annealing por 1 min 30 segundos con la temperatura designada para cada primer de acuerdo con la estandarización mencionado anteriormente, 4. elongación a 72°C por 1 min, 5.

elongación final a 72°C por 5 min. Los pasos del 2 al 4 fueron repetidos por 35 ciclos, para obtener los resultados se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % (Anexo 2). Los amplicones se guardaron a -4°C para luego ser enviados a genotipar.

6.6 Genotipado de las muestras de guayaba

Los amplicones fueron llenados en las placas de MicroAmp[®] Optical, se colocó por pocillo 10 ul del producto de PCR, ya que cada uno de ellos tenía 4 reacciones diferentes pertenecientes a 4 diferentes primers marcados con su respectivo fluoróforo. El genotipado de las muestras se realizó en Macrogen ubicado en Corea, mediante el secuenciador ABI3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems[®], a través de electroforesis capilar se obtuvo el genotipo de cada individuo, es decir los alelos de acuerdo a cada par de primer usado (Analyzers, 2013). Luego los resultados fueron enviados en formato .fsa que fueron analizados en GenMarker[®] de SoftGenetics LLC donde se pudieron observar el/los alelos para cada individuo del estudio para los 13 loci microsatélites usados.

La determinación de los resultados se dio mediante la observación de picos con distintos niveles de fluorescencia detectados por el secuenciador, con el software también se puede determinar el tamaño en pares de bases de los alelos de cada individuo tomando en cuenta el ladder de 500 LIZ como referencia (Luckau, 2013) (Anexo 3). Finalmente se realizó una matriz en la cual se colocó los 95 individuos estudiados con los 13 primers y los alelos encontrados para cada microsatélite que sirvió de base para elaborar los análisis estadísticos (Anexo 4).

6.7 Análisis de datos

Luego de analizar los alelos observados en el Software GeneMarker[®] se realizó una matriz en Excel en la cual se colocó los 95 individuos de todas las localidades en una fila y los 13 primers en una columna. Los análisis se hicieron en el programa R (RStudio, 2016) donde se usó un script que hace uso de los siguientes paquetes: *devtools* fue un paquete necesario para facilitar el desarrollo y uso de paquetes en “R-studio” (RStudio, 2016), *adegenet* y *popr* permiten una discriminación de los componentes principales para la construcción de mapas jerárquicos (“Genomic data”). Las observaciones se clasifican en grupos predefinidos dando valores diferentes, si son bajos se requiere una reasignación de grupo para obtener mejores resultados (Jombart & et.al., 2010). El paquete *ape* analizó los datos para la simulación y construcción de árboles filogenéticos a través del cálculo de distancias genéticas que permite hacer una comparación mediante diversificación (Paradis, 2012). Con el paquete *pegas* se

realizó análisis evolutivos y de poblaciones que sirvió de base para el AMOVA. El paquete *ade4* con datos ecológicos y ambientales usa el método euclidiano para determinar filogenias y rasgos cuantitativos (Dray & et.al, 2017).

Con *diversity* se identificó índices de diversidad y abundancia de alelos (Kindt & Coe, 2005). El paquete *hierfstat* sirvió para determinar haploidia o diploidia de acuerdo al estadístico F y con este la razón de verosimilitud G (Yang, 1998). El paquete *ggplot2* junto a *ggfortify* y *ggord* realizaron gráficos en base a capas o “layers”, y la transformación estadística de los datos para posicionarlos en un plano cartesiano (Chang, Field, & Wickham, s.f.). El Paquete *cluster* se usó para el cálculo de agrupaciones jerárquicas acumulativas en los datos analizados (RStudio, 2016).

El Software HP-RARE 1.0 sirvió para realizar el proceso de rarefacción, a través del cálculo de la mediana para toda la población analizada (95 individuos) de esta manera se elimina el sesgo producido por la heterogeneidad en el número de muestras por cada subpoblación el cual permite el cálculo de la riqueza alélica y el número de alelos (Kalinowski S. , s.f.).

El Software STRUCTURE 2.3.4 sirvió para el análisis de la genética de poblaciones y para realizar la estructura poblacional mediante inferencia bayesiana usando cadenas de Markov tipo Monte Carlo que es un método de simulación que permite la estimación de frecuencias alélicas (González, s.f.), los resultados fueron procesados en “R-studio” usando el paquete *pophelper* que discrimina poblaciones y determina la estructura a través de un gráfico (Francis, 2018).

El Software BOTTLENECK 1.2.02 es una herramienta que detecta las reducciones efectivas recientes en el tamaño de la población a partir de los alelos encontrados en toda la población analizada (Montpellier, 2018).

Mediante *Coancestry* se analizó los niveles de parentesco entre los individuos del estudio usando los valores del índice de Wang (Wang, 2011).

Con el software *Arlequin* 3.5 se hizo el análisis de varianza molecular para establecer de donde proviene la mayor variación genética y la prueba de Mantel para saber si existe una correlación entre las distancias genéticas y geográficas (Excoffier & Lisher, 2015).

El Software *ArcGis* permitió la realización de mapas de acuerdo a la ubicación geográfica de los datos dentro de la isla (GeoInnova, 2017).

7. Resultados

7.2 Extracción y cuantificación de las muestras de *P. guajava*

Se logró extraer ADN de los 95 individuos de *P. guajava* pertenecientes a la Isla Isabela de acuerdo con el protocolo descrito en la sección 6.2. Mediante el Nanodrop 1000 (Termo Fisher Scientific) se cuantificó cada muestra para estimar la calidad y pureza del ADN. En general las concentraciones de ADN y su pureza estuvieron en los valores esperados para proceder con la amplificación (Anexo 5).

7.3 Estandarización de primers homólogos para guayaba

Se probó los 13 pares de primers homólogos específicos para guayaba, con el fin de determinar las condiciones adecuadas de PCR y la temperatura de annealing en cada caso. En su mayoría resultó ser de 55°C, excepto para 3 primers (Tabla 3). Adicionalmente, ciertas muestras fueron amplificadas nuevamente con los 13 primers aumentando el tiempo de extensión de un minuto a dos minutos para obtener los resultados esperados. Todas las muestras de guayaba fueron amplificadas y genotipadas de acuerdo al protocolo establecido.

7.4 Amplificación de los microsatélites por PCR y genotipado de las muestras de guayaba

Al analizar los datos obtenidos, 11 de los 13 loci resultaron ser polimórficos. Los primers mPgCIR13 y mPgCIR26 fueron monomórficos.

Para el análisis de los datos solamente se consideró los 11 loci polimórficos que dio un número total de 40 alelos, con un rango de 2 a 6 alelos por locus, un promedio de 3,63 alelos por cada par de primer. Los más informativos fueron mPgCIR7 y mPgCIR8 que presentaron 5 alelos, mientras que mPgCIR09 y mPgCIR22 tuvieron 6 alelos (Tabla 2).

Los primers mPgCIR11, mPgCIR21 y mPgCIR25 fueron los menos informativos ya que se encontró 2 alelos para cada par de primers (Tabla 2).

7.5 Análisis de datos

7.5.1 Diversidad alélica

Se analizó el número de alelos y de alelos privados por localidades y por subpoblación (Tabla 3 y Tabla 4). Los valores obtenidos por localidades mostraron que Los Ceibos y Volcán Sierra Negra tuvieron mayor riqueza alélica con 26 alelos. Existieron alelos privados en Barrio Loja, Merceditas, Volcán Sierra Negra y Finca Morocho, la última localidad mencionada tuvo el mayor número de alelos privados que fue de 2. Para entender mejor la diversidad genética de la guayaba en Isabela se procedió a realizar subpoblaciones, de esta manera se puede estudiar la diversidad genética a escalas más grandes, ya que las localidades más cercanas geográficamente estarían formando un solo grupo, además al realizar estas agrupaciones se trata de homogenizar el número de muestras para evitar una pérdida de información.

Las subpoblaciones fueron realizadas dividiendo el plano cartesiano de la zona estudiada en la isla Isabela desde noreste a sureste en partes iguales, cada cuadrante midió 2 km, en cada uno de ellos se situaron las localidades más cercanas formando los distintos grupos, esto dio un total de 7 subpoblaciones (Figura 2). Para el análisis del número de alelos totales y privados fue necesario el uso del Software HP-RARE 1.0 en base al método estadístico rarefacción. Con este software se estimó la cantidad de alelos que se espera tener en una muestra de tamaño específico (Kalinowski S. , 2005). El tamaño de la muestra fue de 12, este valor representa a la mediana de toda la población, ya que devuelve la tendencia central de los datos eliminando el sesgo en los resultados y evita la pérdida de información (Morales, 2012). La subpoblación de la Zona Puerto Villamil tuvo la mayor cantidad de alelos con un total de 28, mientras que la subpoblación Fincas y Límite de la Zona Agrícola tuvo el mayor número de alelos privados que fue de 2 (Tabla 4).

7.5.2 Diversidad genética

La heterocigosidad observada (H_o) permite identificar el número de heterocigotos presentes en la población analizada (Cabrerero & Camacho, s.f). Los valores para H_o en las localidades estuvieron en un rango de 0,04 a 0,2, con un promedio de 0,104. Las localidades de Cueva de Sucre, Finca Ricardo García y Los Tintos fueron las que presentaron una H_o menor con un valor de 0,045. Por otro lado El Ocho ($H_o= 0,204$) y Volcán de Azufre ($H_o= 0,21$) fueron las que tuvieron valores mayores en heterocigosidad observada (Tabla 5).

La heterocigosidad esperada (H_e) es la fracción estimada de todos los individuos que pueden ser heterocigotos para cualquier locus que se toma al azar (Cabrero & Camacho, s.f). En la población analizada se encontró una H_e en un rango de 0,03 a 0,36, con un promedio de 0,218. Los Tintos fue la localidad con el menor valor de $H_e=0,0369$, mientras que El Cura tuvo un mayor valor igual a 0,3672. Los Tintos fue la única localidad en la que la $H_e=0,0369$ fue menor a la $H_o=0,045$ (Tabla 5).

En las subpoblaciones, la H_o estuvo en un rango de 0,06 a 0,14, con un promedio de 0,103. El Cura fue la subpoblación que presentó la menor $H_o=0,0603$ y Zona Puerto Villamil tuvo la mayor $H_o=0,137$. Por otro lado la H_e con una rango de 0,13 a 0,37 y un promedio de 0,26. Esperanza, Los Tintos y Cerro Grande (ETC) tuvo la menor $H_e=0,1321$ y El Cura obtuvo la mayor $H_e=0,367$. La H_e fue mayor que la H_o en las 7 subpoblaciones (Tabla 6).

7.5.3 Diferenciación genética

La diferenciación genética fue determinada con las distancias genéticas F_{st} . Se obtuvo una mayor distancia entre la subpoblación de la Zona de Puerto Villamil y ETC (0,13384), mientras que la menor distancia es entre Fincas y Límite Zona Agrícola con Los Mellizos (0,0035) (Tabla 7).

Al analizar la distancia F_{st} global por subpoblación (0,040) y por localidad (0,028) se demostró que hay una poca diferenciación genética discernible entre las subpoblaciones. Esto quiere decir que hay un menor efecto de la deriva génica, por lo tanto hay una menor diferenciación genética entre las poblaciones analizadas.

7.5.4 Estructura poblacional

El análisis de la varianza molecular o AMOVA determinó que la variación genética proviene principalmente dentro de las subpoblaciones con un 62,44%. El resto proviene entre individuos con 34,96% y entre poblaciones con 2,60% (Figura 3).

El árbol de “Neighbor Joining” basado en las distancias genéticas de Nei demostró que los individuos pertenecientes a la subpoblación de ETC, El Cura y Zona Puerto Villamil poseen mayores distancias genéticas con respecto al resto de subpoblaciones (Figura 4).

El análisis de coordenadas principales (PCoA) elaborado a partir de las distancias genéticas euclidianas mostró que todos los individuos analizados están mezclados entre sí, sin embargo se sugiere la formación de 3 grupos (Figura 5).

El software STRUCTURE utiliza un método de asignación bayesiana para estimar las frecuencias alélicas utilizando cadenas de Markov tipo Monte Carlo hasta encontrar el K que mejor se ajusta a los datos (Sim, s.f). Con esto se determina si la población tiene estructura. Se estableció un rango de K de 1 a 4, donde $K=2$ ($\Delta K=27,49$) fue el que mejor se ajustó. La Figura 6 demuestra que existen dos líneas ancestrales que contribuyen a la genética de todos los individuos de todas las subpoblaciones. El linaje en color morado contribuye en mayor cantidad en las subpoblaciones de la Zona del Volcán, Zona Puerto Villamil y El Cura, mientras que el linaje verde contribuye en gran medida a individuos pertenecientes a Los Mellizos, ETC, Fincas y Límite Zona Agrícola y la Zona Agrícola Centro.

7.5.5 Nivel de parentesco y endogamia

Se utilizó el Software “Coancestry” para el análisis del nivel de parentesco entre los individuos estudiados, para esto se utilizó el método de Wang que permite hacer un análisis molecular pareado de las muestras en cada grupo establecido para determinar si existe similitud genética entre ellos que puede ser explicado por endogamia (Wang, 2011). Los valores positivos indican que los individuos posiblemente estén emparentados, mientras que los negativos determinan que no están emparentados.

El coeficiente global de ancestro fue de -0,477. En la comparación la mayoría de subpoblaciones presentaron valores negativos, excepto entre Los Mellizos con ETC y ETC con Fincas y Límite de Z. Agrícola. El análisis entre individuos de la misma subpoblación mostró que Los Mellizos y ETC presentaron valores positivos (Tabla 8).

7.5.6 Endogamia, efecto fundador, migración y flujo génico que influyen en la población de guayaba en la Isla Isabela

El índice de endogamia (Fis) fue mayor a cero dentro de las localidades (0,6101) y dentro de las subpoblaciones (0,6227). Las estimaciones a través de “likelihood” mostraron que la mayoría de individuos de guayaba en Isabela poseen un coeficiente F (promedio) entre 0,3 a 0,6 en una distribución cercana a la normal. Sin embargo, esta distribución se ve alterada por valores de F mayores a 0,6; ya que 32% (30 individuos) de la población total tuvo valores F entre 0,7 y 0,8. Estos individuos generaron una distribución binomial, lo que sugiere que esta proporción de la población posee altas tasas de endogamia (Figura 7).

Para determinar si en la población analizada de guayaba existió un efecto fundador se usó el software BOTLENECK, con la prueba no paramétrica de Wilcoxon, el programa considera

dos modelos mutacionales: *Stepwise Mutation Model* (SMM) y *Two-Phase Model* (TPM). El resultado determinó que siguiendo el modelo SMM existe una deficiencia de heterocigosidad (prueba de una cola), el valor obtenido fue de 0,0105 que es menor al valor p (Tabla 9).

7.5.7 Comparación de la diversidad alélica y genética de la guayaba en la Isla Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal

El número de alelos totales y alelos privados para las 3 islas necesitó ser corregido por rarefacción. La isla Isabela tuvo una mayor cantidad de alelos con un total de 22, seguida por Santa Cruz con 21 y San Cristóbal con 20. En cuanto a los alelos privados la población de Isabela fue la única que tuvo estos alelos que fueron 4 (Tabla 10).

En cuanto a los valores de heterocigosidad, la H_e estuvo en un rango de 0,28 a 0,37. Mientras que la H_o entre 0,10 a 0,21. La H_e fue mayor en la isla Santa Cruz con un valor de 0,3647. Para las 3 islas la H_o fue menor que la H_e (Tabla 11).

7.5.8 Diferenciación genética en las 3 islas

Los F_{st} calculados indicaron que la mayor diferenciación genética se dio entre la Isla Isabela con Santa Cruz con un valor de 0,09033. La menor diferenciación genética fue entre Santa Cruz y San Cristóbal con 0,04365, sin embargo son valores cercanos a cero, lo que indica una falta de diferenciación entre las islas estudiadas. Esto se comprueba con el F_{st} global obtenido (0,1416), ya que también fue cercano a cero (Tabla 12).

7.5.9 Estructura poblacional en las 3 islas

El análisis de varianza molecular para las 3 islas demostró que el aporte proviene principalmente dentro de las subpoblaciones con un 45,37%, seguido de entre individuos entre poblaciones con un 41,94% y el 12,67% entre poblaciones (Figura 8).

El análisis del árbol de Neighbor Joining determinó que los individuos de la Isla Isabela poseen la mayor de distancia genética si se comparan los 3 grupos, seguido por Santa Cruz y San Cristóbal (Figura 9).

El análisis de coordenadas principales realizado para las 3 islas demostró que hay una separación evidente entre los individuos de Isabela y San Cristóbal, mientras que los individuos de Santa Cruz se encuentran entre los de Isabela y San Cristóbal (Figura 10).

Se analizó las poblaciones de las 3 islas en STRUCTURE para determinar si existe o no estructura en cada isla. Los resultados demostraron que existe la contribución de dos linajes

($K=2$) con un $\Delta K=249$ que fue el valor mayor en un rango de K de 1 a 4. Al observar el gráfico, en San Cristóbal el linaje de color salmón es el que predomina sobre el linaje de color verde. En Isabela existe la contribución de los dos linajes, pero el que más contribuye es el linaje en color verde. En Santa Cruz sucede lo contrario, el linaje que contribuye en mayor medida es el de color salmón (Figura 11).

8. Discusión

8.2 Diversidad alélica

Para los individuos de guayaba en la isla Isabela se encontró un total de 40 alelos, con un rango de 2-6 alelos por locus. Existió un total de 3 alelos privados. La corrección por rarefacción demostró que sí hay un cambio significativo en el número total de alelos y en los alelos privados, esto quiere decir que la heterogeneidad en el número de muestras por localidad afectó a la diversidad (Tabla 3).

El número de alelos encontrados en la isla Isabela es alto si se compara con el estudio en Cuba de la misma planta, se encontró un total de 34 alelos con un promedio de 4,57 alelos por cada locus (Valdés & et.al., 2007). A pesar de que la isla de Cuba tiene mayor superficie que Isabela, la mayor cantidad de alelos en la última isla puede deberse a que se analizó una mayor cantidad de individuos, ya que en el estudio de Cuba solamente fueron analizados 34 individuos, mientras que en Isabel se analizaron 95. Esto sugiere que hay una mayor posibilidad de encontrar más riqueza alélica. El número de alelos privados encontrados en la población de guayaba en la Isla Isabela es un valor bajo, pero puede ser un indicador de varias introducciones a la isla, ya que los múltiples orígenes que posiblemente tenga la población en la isla estaría contribuyendo en su diversidad genética (Hagenblad, et.al.; 2015).

8.3 Diversidad genética

En el análisis de la frecuencia de heterocigotos los resultados obtenidos fueron $H_e = 0,2842$ y la $H_o = 0,104$, donde la H_o es menor a la H_e (Tabla 5 y Tabla 6). Esto quiere decir que existe una deficiencia de heterocigotos en la población (Hernández & et.al., 2009). La diversidad genética baja puede ser explicada por las formas de reproducción de la guayaba y por el efecto fundador.

La guayaba posee reproducción sexual (autopolinización) y asexual (propagación vegetativa). La autopolinización es un proceso en el cual el polen cae a los estigmas de la misma flor (Trujillo, 2004). La guayaba posee flores perfectas lo que ayuda a la autofecundación, por lo tanto hay la posibilidad del incremento de homocigotos. Valores medios y bajos en heterocigosidad también fueron obtenidos en el estudio realizado en Cuba y sugieren la autopolinización como un factor que contribuye a un alto número de homocigotos (Valdés & et.al., 2007). La propagación vegetativa es la obtención de una nueva planta a partir de células, tejidos u órganos de una planta madre. Este mecanismo disminuye la diversidad

genética de una población, ya que estos individuos son genéticamente iguales (Malkum, 2015). Las plantas de guayaba tienen la capacidad de propagarse mediante acodos aéreos, brotes de raíz, estacas, injertos y rizomas lo que reduce la posibilidad de tener diversidad entre los individuos (CONABIO, 2009).

El efecto fundador también es un factor que afecta a la diversidad genética. Las primeras plantas que llegan a una isla son pocas y tomadas al azar de la población continental, esto disminuye la posibilidad de introducir una gran cantidad de heterocigotos, y una gran parte de la diversidad de la población ancestral se pierde durante la colonización de una isla (Stuessy & et.al., 2014) (Frankham, 1997). Si la población colonizadora es pequeña, la diversidad también lo será al ser comparada con la población original (Stuessy & et.al., 2014).

Debido a que no se ha hecho un estudio de diversidad genética de *Psidium guajava* en Ecuador continental, se comparó los datos obtenidos con estudios de diversidad de la guayaba en ecosistemas continentales en los cuales también se usaron marcadores microsatélites. Kanupriya, et.al. 2011 y Da Costa y Forni, 2006 realizaron estudios en guayaba utilizando marcadores microsatélites en la India y Brasil respectivamente y obtuvieron H_e superiores a la reportada para este estudio. En el caso de los individuos analizados en India el valor fue de 0,824, mientras que para las muestras de Brasil fue de 0,733. Por lo tanto se sugiere que la diversidad de genes en islas es menor que en poblaciones del continente.

Se comparó la diversidad de guayaba como especie invasora en la Isla Isabela con otras especies que también son invasoras en ecosistemas insulares. *Cortaderia jubata* y *C. selloana* en Nueva Zelanda (Houliston & Goeke, 2017) y *Miconia calvescens* situada en las islas del Pacífico (Le Roux & et.al., 2010) poseen una diversidad genética baja como se esperaba. Pero *Senesio madagascarensis* (Le Roux & et.al., 2010) y *Paraserianthes lophantha* (Thompson & et.al., 2016) en Hawái muestran niveles más altos de diversidad genética que son inesperados para una población invasora en islas. Para la guayaba en Isabela, el valor de la diversidad estuvo en un rango intermedio al compararse con las especies mencionadas. Los resultados encontrados son variables lo que sugiere la presencia de varios factores que afectan a la diversidad genética en una población invasora. Estos incluyen el número de introducciones, la biología de las especies, la geografía de los ecosistemas que han sido invadidos y el efecto fundador de la planta (Stuessy & et.al., 2014) (Hagenblad & et.al., 2015).

8.4 Diferenciación genética

El índice de fijación (F_{st}) es un valor estadístico que evalúa el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones analizadas (IPGRI; Cornell University, 2004). Los valores obtenidos de F_{st} entre localidades (0,028), entre subpoblaciones (0,0420) y los F_{st} “pairwise” (Tabla 7) indicaron que hay una falta de diferenciación genética, ya que fueron cercanos a cero. Esto sugiere un alto flujo génico entre las subpoblaciones que puede darse por el movimiento de los dispersores.

Ciertas aves como los cucuves (*Nesomimus sp.*) y pinzones (*Geospiza fuliginosa.*) se alimentan de la guayaba. A pesar de esto poseen una digestión rápida y sus áreas de vida son reducidas (no sobrepasan el kilómetro cuadrado) (Buddenhagen & Jewell, 2006). Esto quiere decir que las aves no contribuyen en gran medida con la dispersión de la guayaba en la isla Isabela. Además la mayoría de especies de pinzones no utilizan los árboles de la guayaba para alimentarse de sus frutos. Los usan para caminar, descansar y también para cortejarse (Herrera, 2013).

Se sugiere que los principales dispersores de *P. guajava* en la Isla Isabela son los reptiles, animales domésticos y el ser humano. Especies de reptiles como lagartija de lava (*Microlophus bivittatus*) y tortugas de galápagos (*Chelonoidis nigra*) han demostrado cierta preferencia por los frutos de guayaba por su sabor y textura (Heleno & et.al., 2013). Las semillas más comunes encontradas en las excretas de estos animales eran de guayaba. La digestión de estos reptiles es más lenta que en las aves, por esto las semillas pueden ser retenidas en su organismo aproximadamente 12 días, en este tiempo tienen la capacidad de recorrer grandes distancias ayudando a la dispersión de esta especie (Blake & et.al., 2012).

Dentro de los animales domésticos, se sugiere que el caballo es el principal dispersor de semillas de guayaba dentro de la Isla Isabela. Estos animales son movidos de un lado a otro a través de la zona agrícola para que se alimenten y descansen, lo que contribuye al movimiento de *P. guajava*. Se ha encontrado semillas en las excretas de las vacas, pero al ser rumiantes verdaderos podría existir una degradación del material vegetal impidiendo la germinación, en cambio en el caballo esto no ocurre. Adicionalmente se ha evidenciado que la germinación de las semillas en las heces de caballo es mejor que en la de ganado vacuno por su alto contenido de nitrógeno, permitiendo el desarrollo y el crecimiento de las plantas de guayaba (Herrera, 2013). Otro importante dispersor es el ser humano, gracias a sus actividades comerciales en

toda la zona poblada contribuye con la dispersión y el flujo génico encontrado en Isabela (Lundh J. , 2004).

8.5 Estructura poblacional

Los resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) demostraron que la variabilidad proviene principalmente dentro de las subpoblaciones con un 62,44% (Figura 3). Esto sugiere que las subpoblaciones no están altamente diferenciadas (Sanabria & et.al., 2008), lo cual se corrobora con los F_{st} encontrados. Los resultados sugieren un alto flujo génico entre las subpoblaciones.

El dendrograma basado en las distancias genéticas de Nei sugiere que los individuos pertenecientes a ETC, El Cura y Zona Puerto Villamil poseen mayores distancias genéticas en comparación con el resto de subpoblaciones (Figura 4), sin embargo en el PCoA todos los individuos de todas las subpoblaciones se encuentran mezclados entre sí, esto sugiere que hay flujo génico en toda la población analizada. En el PCoA se evidenció la formación de 3 grupos, cada uno de ellos acoge a individuos de todas las subpoblaciones. Esto podría ser explicado por el movimiento de dispersores ocasionales en ciertas áreas que tienen la capacidad de moverse largas distancias cuando se dan condiciones ambientales inusuales. Debido al cambio de las condiciones climáticas, como el aumento de temperaturas o una mayor frecuencia en las tormentas, afectaría a los seres vivos que habitan en las islas limitando el acceso a ciertos alimentos, por lo tanto herbívoros que usualmente no se mueven largos trayectos ni se alimentan de guayaba tienen que conseguir este fruto lo que los obliga a desplazarse entre ciertas áreas, provocando eventos raros de dispersión que ocurren ocasionalmente (Slatkin, 1994). Es necesario un estudio aparte que brinde la información requerida en base a estimaciones de la frecuencia con la que se dan estos sucesos que complementen los resultados obtenidos en este trabajo.

Los resultados encontrados siguen corroborando la existencia de flujo génico dentro de la población de guayaba analizada en la isla Isabela. No existe un agrupamiento geográfico de los individuos. Al sugerir alto flujo génico, la población de *Psidium guajava* establecida en la Isla Isabela puede mantener la cantidad de heterocigotos, lo que contribuye a su resistencia a cambios ambientales, otras plagas, enfermedades y proliferación a nuevas zonas (no cultivadas) dentro de la isla (Pérez & Legaria, 2007).

La estructura poblacional calculada a través del uso del programa STRUCTURE, determinó que existe la contribución de dos linajes ($\Delta K=27,49$). No existe una estructura poblacional definida, ya que las dos líneas ancestrales están contribuyendo para las 7 subpoblaciones. Se sugiere 2 o más introducciones de germoplasma (Figura 6).

La estructura de poblaciones está relacionada con la variabilidad genética. La falta de grupos definidos en la isla tiene que ver con la variación genética dentro de cada subpoblación (Rimieri, 2013), sustentando lo encontrado en AMOVA donde la mayor variación génica proviene dentro de las subpoblaciones. El mantenimiento de la variabilidad puede ser explicado por la reproducción cruzada que mantienen ciertos individuos dentro cada subpoblación analizada que le dio la ventaja de mantenerse para luego expandirse a nuevos lugares (Tsutsui, Suarez, Holway, & Case, 2000).

8.6 Nivel de parentesco y endogamia

La endogamia presente en el 32% de la población de *Psidium guajava* puede ser explicada por el nivel de parentesco existente entre individuos de Los Mellizos, esto también ocurrió en ETC. Existió una relación cercana entre individuos de Los Mellizos y ETC, y entre individuos de las Fincas y Lím. Zona Agrícola con ETC (Tabla 8). El índice de Wang fue calculado mediante el software “Coancestry” que hace un análisis pareado para detectar individuos que presentan una mayor similitud genética (Wang, 2011). En este caso los individuos de las subpoblaciones mencionadas tuvieron valores positivos. En cambio el resto de comparaciones pareadas resultó en números negativos lo que indica que no existe parentesco.

La relación cercana entre los individuos que conforman la subpoblación de ETC y los individuos que forman a Los Mellizos puede explicarse porque la mayoría de individuos se autofecundó o por una reproducción cruzada con los más cercanos geográficamente, ya que estas subpoblaciones se encuentran un poco distantes del resto (Figura 2). Por otro lado el parentesco entre plantas de ETC con las de Fincas y Lím. Zona Agrícola sugiere que la cercanía geográfica existente entre estas dos subpoblaciones permite una mayor cantidad de eventos de reproducción entre estas dos subpoblaciones, al parecer no existe una barrera geográfica que impide el cruce de plantas pertenecientes a las 2 subpoblaciones mencionadas. El parentesco entre Los Mellizos con individuos de ETC, que son subpoblaciones con mayor distancia geográfica, sugiere que su relación cercana tiene que ver con el movimiento de los dispersores, puede que ciertas aves como pinzones o herbívoros y reptiles como las tortugas y lagartijas tengan un movimiento que involucre a estas dos zonas y prefieran comer el fruto de la guayaba

de esos lugares, (Heleno & et.al., 2013) y no al que se encuentra en la Zona Agrícola Centro (Figura 2).

8.7 Endogamia, efecto fundador, migración y flujo génico en la población de guayaba en la isla Isabela

La prueba de endogamia fue realizada porque la guayaba tiene la capacidad de autopolinizarse. El índice de endogamia (F_{is}) dentro de las localidades (0,6101) y dentro de las subpoblaciones (0,6227) resultó cercano a 1. Estimaciones a través de “likelihood” mostraron que la mayoría de individuos en Isabela poseen un coeficiente F (promedio) entre 0,3 a 0,6 en una distribución cercana a la normal. Esta distribución se ve alterada porque el 32% de la población presentó valores F entre 0,7 a 0,8 (Figura 7), lo que sugiere que esta proporción de la población tiene altas tasas de endogamia.

De acuerdo con la literatura, el índice F_{it} depende de F_{is} y F_{st} para el estudio de la endogamia. F_{it} representa a la endogamia encontrada en toda la población analizada. En cambio el índice F_{is} estudia la endogamia presente en los individuos con relación a la subpoblación a la que pertenecen. Por otro lado, el índice F_{st} relaciona la endogamia con la diferenciación genética entre subpoblaciones tomando en cuenta a la población total. Esto quiere decir que tanto F_{is} como F_{st} tienen una relación directamente proporcional con el índice F_{it} .

En este caso los valores encontrados de F_{is} mayores a 0 y valores de F_{st} cercanos a 0, presentados anteriormente, sugieren que las frecuencias alélicas son similares entre las subpoblaciones y esto puede ser explicado el alto flujo génico entre las diferentes subpoblaciones (Ballou, 2010). El índice F_{is} igual a 0,63 muestra que la población total de guayaba analizada posee altas tasas de endogamia. Esto se explica porque la guayaba se autopoliniza y reproduce asexualmente con una frecuencia de hasta un 60% (Sithther & et.al., 2014).

Con el Software BOTTLENECK se determinó de acuerdo al modelo SMM que existe una deficiencia de heterocigosidad (prueba de una cola). El valor fue de 0,0105 (menor al valor p) (Tabla 9). Para la población de guayaba significa que en un principio la población tenía un exceso de homocigotos ($F_{is} > 0$). Esto está relacionado con los resultados encontrados en estructura poblacional, donde se sugiere 2 o más introducciones de germoplasma en Isabela que pueden haber aumentado el valor de H_e en el equilibrio mutación y deriva génica, puede

haber influenciado en el número total de alelos encontrados (40) (Piry, Luikart, & Cornuet, 1999), explicando la deficiencia de heterocigosidad dada por el software.

8.8 Comparación de la diversidad alélica y genética de la guayaba en la Isla Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal

La isla Isabela tuvo una mayor cantidad de alelos con un total de 22, seguida por Santa Cruz con 21 y San Cristóbal con 20. En cuanto a los alelos privados, la población de la Isla Isabela fue la única con estos alelos con 4 (Tabla 10). Esto significa que Isabela posee una mayor riqueza alélica si se compara con las otras dos islas. Es importante mencionar que para el estudio realizado en San Cristóbal (Ponce M. J., 2014) la metodología usada fue a través de geles de poliacrilamida lo que puede sesgar los resultados, ya que este método no distingue alelos que tienen un par de bases como diferencia (Urquía, 2018).

La H_e estuvo en un rango de 0,28 a 0,37. Mientras que la H_o entre 0,10 a 0,21. La H_e fue mayor en la isla Santa Cruz con un valor de 0,3647, seguida de San Cristóbal con 0,3566 e Isabela con 0,2042. Para las 3 islas la H_o fue menor que la H_e (Tabla 11). Esto significa que en las 3 poblaciones existe una deficiencia de heterocigotos explicada por las formas de reproducción de la guayaba: autopolinización y propagación vegetativa (Valdés & et.al., 2007). Se sugiere que la diversidad genética en las poblaciones de las 3 islas es baja, ya que son ecosistemas insulares. Esto se corrobora con datos de estudios en continentes de la misma planta, donde la H_e es mayor (0,8) (Da Costa & Forni, 2006) (Kanupriya & et.al, 2011). Unos pocos individuos salen desde el continente hacia islas para colonizar por lo que las poblaciones empiezan con una variación genética baja (Kanupriya & et.al, 2011).

8.9 Diferenciación genética de las 3 islas

Los valores de F_{st} resultaron bajos en las 3 poblaciones analizadas (cerca de 0). La poca diferenciación genética entre las 3 islas sugiere que existe una relación cercana entre las 3 poblaciones (Tabla 12). Esto significa que al parecer tienen ancestros en común, esto podría deberse a que la guayaba se encuentra en islas con población humana, por lo tanto la historia de colonización explicaría mejor las introducciones de guayaba en cada isla, el tiempo en el que ocurrieron y a qué isla llegaron primero.

8.10 Estructura poblacional en las 3 islas

Para identificar de donde proviene la variación genética se realizó un AMOVA para las 3 islas. Se demostró que el aporte proviene principalmente de los individuos dentro de cada isla con un 45,37% (Figura 8). Al igual que en los resultados obtenidos solo para la Isla Isabela, existió una falta de diferenciación entre las 3 poblaciones que sustenta lo encontrado en los valores de F_{st} obtenidos.

Al comparar las 3 islas, la población de la Isla Isabela es la más distante genéticamente (Figura 9). En cuanto al PCoA, los individuos de Isabela y San Cristóbal se encuentran distantes entre sí, mientras que los de Santa Cruz están distribuidos entre la población de San Cristóbal (en su mayoría) y la de Isabela (Figura 10). Esto sugiere que el origen de las plantas de guayaba que colonizaron a Santa Cruz proviene de estas dos islas mencionadas.

Para el análisis de la estructura poblacional a través de STRUCTURE, se determinó la contribución de 2 linajes ($K=2$) con $\Delta K=249$. Los resultados muestran que la población de San Cristóbal e Isabela pertenecen a grupos diferentes. En la población de Isabela, a pesar de que existe una contribución del linaje de San Cristóbal en menor proporción, ocurrió una introducción independiente (linaje predominante en color verde). En cuanto a la población de Santa Cruz se observa que existe la contribución del linaje de Isabela (verde) y en mayor proporción el linaje de San Cristóbal (salmón) (Figura 11). Esto sugiere que la guayaba llegó primero a San Cristóbal, luego a Isabela y finalmente a Santa Cruz.

8.11 Historia de la colonización de las islas e introducción de *Psidium guajava*

Para sustentar los resultados hallados, es necesario establecer una relación entre los resultados de estructura poblacional con la historia de colonización de las 3 islas (San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela), ya que con la llegada del hombre al archipiélago y el desarrollo de actividades agrícolas se puede inferir acerca de la presencia de guayaba en Galápagos (cuándo y cómo).

De acuerdo con datos de colonización en las islas Galápagos, se sugiere que la guayaba llegó a San Cristóbal en el siglo XIX (entre 1889- 1990), se dice que los primeros árboles de guayaba se encontraban en la hacienda de Manuel Cobos como plantas ornamentales. En el año de 1870, Cobos estableció una plantación de caña de azúcar rentable en las tierras de San Cristóbal, pero en los años 20, las plantaciones fueron desplazadas por bosque monotípico de

P. guajava, y en la década de 1930 ya era considerada una plaga. Posterior a esto se dice que llegó y se expandió en la Isla Floreana, que es la primera isla que fue colonizada por el ser humano. Debido a estos problemas ocurridos en estas dos islas, los pobladores de Santa Cruz trataron de eliminar toda planta de guayaba, sin embargo no fue posible y en 1950 se extendió sin control alguno. En el caso de Isabela no existen datos acerca de cuándo la guayaba resultó ser invasora, este suceso simplemente ocurrió y persistió a través del tiempo (Lundh J. , 2006).

Para entender mejor la llegada de guayaba a las islas Galápagos es necesario tener en cuenta qué sucedió en cada isla analizada, empezando por San Cristóbal, los datos moleculares al parecer corroboran la historia de colonización. Se sugiere que las plantas de guayaba en San Cristóbal son el origen de la plaga que posteriormente se diseminó a Floreana, Isabela y finalmente a Santa Cruz (Lundh J. , 2006). El gráfico obtenido en STRUCTURE (Figura 11) muestra que el linaje de la población de San Cristóbal está presente en mayor proporción en la población de Santa Cruz y en menor medida en la población de Isabela, así como en el PCoA (Figura 10) los individuos de Santa Cruz se encuentran entre los de San Cristóbal e Isabela.

Continuando con Isabela que a pesar de no tener mucha información de la invasión de la guayaba, se sugiere que esta planta llegó en el año de 1897 cuando Antonio Gil, luego de haber vivido por 4 años en Floreana, decide mudarse a Isabela. Los resultados obtenidos en STRUCTURE (Figura 11) muestran la contribución de dos linajes para la población de Isabela, uno de ellos proveniente de San Cristóbal y Floreana, mientras que el otro al parecer es de una introducción independiente.

Es importante recalcar que antes de la introducción de guayaba a Isabela, los pobladores de San Cristóbal y Floreana intercambiaban actividades comerciales, y parecería ser que Antonio Gil introdujo una guayaba a Isabela proveniente de las dos islas, Floreana y San Cristóbal (Lundh J. , 2004). Por otro lado, la introducción independiente pudo haber ocurrido después de los años 50 luego de que el penal establecido en esta isla fue cerrado, ya que este evento causó un aumento en la llegada de población humana. Se cree que los nuevos pobladores llegaron desde las otras islas ya pobladas y también de Ecuador continental, ellos acostumbraban a llevar consigo plantas, incluida la guayaba, para fines agrícolas, alimentación y para la cría de ganado (Lundh J. , 2006).

Finalmente en Santa Cruz, se sabe que los asentamientos comenzaron a partir de 1910 por antiguos trabajadores de Manuel Cobos que habitaban en San Cristóbal y a partir de los años 20, llegaron colonos de Ecuador continental que trajeron ganado, también llegaron alemanes y

noruegos. Por lo tanto la guayaba pudo haberse establecido entre 1910 a 1930, y su expansión descontrolada ocurrió en 1950 (Lundh J. , 2004). Los datos históricos y los resultados obtenidos en STRUCTURE comprueban que la población ancestral derivó de San Cristóbal y llegó a Santa Cruz, mientras que el linaje de Isabela presente en la población de Santa Cruz pudo haber llegado en la década de 1960 porque los habitantes de Isabela, San Cristóbal y Floreana decidieron mudarse a Santa Cruz por el auge del turismo (Latorre, 1997).

Con todo lo mencionado anteriormente el bajo flujo génico entre la población de guayaba de Isabela y San Cristóbal puede ser explicado por la separación geográfica, estas dos islas se encuentran en extremos opuestos del archipiélago, lo que disminuye la posibilidad de un mayor movimiento de seres humanos entre sí. Se sugiere que una vez que los asentamientos humanos estuvieron bien establecidos en las islas, las actividades comerciales aumentaron entre ellas. En este caso al parecer Santa Cruz, ubicada en medio de San Cristóbal e Isabela tuvo relaciones comerciales con estas dos islas por separado, por esto es que posee la contribución de los dos linajes.

8.12 Aporte del estudio de Diversidad Genética de *Psidium guajava* en la Isla Isabela: ¿Es posible el control de esta planta invasora?

De acuerdo con la teoría de la genética de poblaciones, una alta diversidad genética debería beneficiar a las especies invasoras lo que le facilita la adaptación a nuevos entornos (Le Roux & et.al., 2010). Los resultados de este proyecto de investigación demostraron que la diversidad genética encontrada fue más alta de lo que se esperaba, y que la población de guayaba ha logrado expandirse y persistir en Isabela, esto quiere decir que es una especie invasora bien adaptada que compete con especies propias de las Galápagos. A pesar del efecto fundador y de su diversidad genética baja, la guayaba ha logrado ser exitosa, posiblemente por sus formas de reproducción (Le Roux, et.al; 2010).

El estudio de la diversidad genética en plantas invasoras como *Psidium guajava*, es importante para entender la respuesta de los organismos a cambios ambientales y a las medidas de control. Esto está relacionado con la correlación significativa y positiva que existe entre la heterocigosidad y el “fitness”. La heterocigosidad posee un vínculo con el tamaño de la población, por lo tanto informa acerca del “fitness” de la población (Reed & Frankham, 2003). De acuerdo con los resultados obtenidos, la heterocigosidad de la población de la guayaba en Isabela fue un poco baja, pero sí existe la posibilidad de mantener el número de heterocigotos mediante reproducción cruzada, lo que ayudaría a resistir cambios ambientales.

Especies invasoras que poseen alta diversidad genética también tienen la capacidad de tolerar estrategias de control, se ha visto que ocurre una rápida evolución frente a estos mecanismos. Una alta diversidad genética y la correlación positiva entre la heterocigosidad con el “fitness” de la población, aumenta la probabilidad de que una especie invasora tenga genotipos que sean resistentes a agentes bioquímicos (García-Rossi, Rank, & Strong, 2003).

La guayaba fue introducida en Galápagos con fines de agricultura pero la falta de control en los suelos considerados para este fin ocasionó la expansión de este cultivo. La presencia de esta planta en bosques nativos es evidente. Considerando que en la Isla Isabela existe una gran superficie de tierra cubierta por guayaba fuera de la zona agrícola evidencia que la diversidad de alelos encontrados en los individuos de este estudio permitió su adaptación y expansión en este ambiente. En el archipiélago la Dirección del Parque Nacional Galápagos y la Fundación Charles Darwin por varios años ha llevado a cabo programas de control para especies de plantas invasoras, además existe un documento denominado Plan de Control de Especies Introducidas del Ministerio del Ambiente (2007) en el cual se promulga la conservación de especies endémicas de Galápagos a través del control tanto de animales como plantas para la recuperación de los ecosistemas. Sin embargo no se ha recopilado información que ayude a saber si estos programas son eficaces (Galapagos Conservancy, 2018). Los resultados encontrados en este estudio sugieren que a pesar de tener una diversidad genética baja, la guayaba en Isabela ha logrado invadir exitosamente la isla Isabela mediante diferentes mecanismos. Esto podría ser un obstáculo para la implementación de planes de control, el efecto no sería el esperado, sobre todo en las zonas agrícolas (Le Roux, Wiczorek & Meyer; 2008). La aplicación de químicos o una eliminación manual de las plantas de guayaba son opciones que se podrían considerar, pero solo en las zonas cultivadas, ya que se trata de áreas definidas (Galapagos Conservancy, 2018). La erradicación de la guayaba podría ser difícil debido a su presencia en zonas de bosques nativos donde el acceso del ser humano es difícil y su expansión en las islas es de cientos de kilómetros. Además si se piensa en un control químico-biológico, este podría afectar a su congénere el guayabillo.

9. Conclusiones

- La diversidad genética encontrada en la población de guayaba en Isabela es baja.
- Las formas de reproducción de la guayaba (sexual y asexual) contribuyeron al éxito de la guayaba como especie invasora.
- Existió la contribución de dos linajes para la población de *Psidium guajava* en la Isla Isabela que aportan en la variación genética de todos los individuos.
- La Isla Isabela tuvo una mayor cantidad de diversidad alélica al ser comparada con las poblaciones de Santa Cruz y San Cristóbal.
- La heterocigosidad esperada en la isla Santa Cruz fue mayor que la población de Isabela y de San Cristóbal, pero la diversidad genética sigue siendo baja ya que se trata de ecosistemas insulares.
- Los análisis de estructura poblacional determinaron la contribución de 2 linajes, las poblaciones de San Cristóbal e Isabela pertenecen a grupos diferentes, mientras que Santa Cruz posee la contribución de estos dos grupos, con una predominancia por parte del grupo de San Cristóbal.

10. Recomendaciones

- Se recomienda la recolección de hojas jóvenes para evitar problemas en la extracción del ADN.
- Se recomienda que el estudio de diversidad genética de *Psidium guajava* también se realice en la Isla Floreana con el fin de tener un estudio completo de la diversidad de esta planta invasora y las implicaciones que traído a las islas Galápagos.
- Se recomienda realizar un estudio de la diversidad genética de guayaba en Ecuador continental para determinar el origen de las plantas de guayaba introducidas en Galápagos que permita relacionar los estudios moleculares con la historia de colonización.

11. Bibliografía

- Aguirre, A., & Mendoza, R. (2009). Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía. *Capital natural de México*, 2, 277-318.
- Aldaz, I. (2008). *Manual de especies nativas y endémicas de Galápagos*. Islas Galápagos: Ministerio del Ambiente.
- Analyzers, A. b. (2013). *Applied Biosystems*. Obtenido de Applied Biosystems: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/brochure-ab-genetic-analyzers.pdf>
- Ballou, F. (2010). *Introduction to conservation genetics* (Segunda ed.). Londres: University of Cambridge.
- Blacket, M., & et.al. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to. *Molecular ecology*, 456-463.
- Blake, S., & et.al. (2012). Seed dispersal by Galápagos tortoises. *Biogeography*, 39, 1961-1972.
- Borrel, A., Brown, L., & Slater, K. (2011). Chemical control of invasive *Psidium guajava* in Swaziland: A preliminary assessment of costs and efficacy . *African journal of agricultural research* , 1-7.
- Bramwell, D., & Pérez, J. (1982). Prioridades para la conservación de la diversidad genética en la flora de las islas Canarias . *Botánica Macronesica* , 3-18.
- Buddenhagen, C., & Jewell, K. (2006). Invasive plant seed viability after processing by some endemic Galapagos birds. *Ornitología Neotropical*, 17, 73-80.
- Cabrero, J., & Camacho, J. (s.f). *Fundamentos de genética de poblaciones*. Genética. Granada: Universidad de Granada.
- Castaño, J., & Montes, J. (2014). *Estudio integral de Psidium guajava en un sistema silvopastoril en el municipio de turbo Antioquía*. Bogotá: UNAD.
- Chang, W., Field, A., & Wickham, H. (s.f). *Gráficos en el paquete ggplot2*. Obtenido de gráficos en el paquete ggplot2: https://rstudio-pubs-static.s3.amazonaws.com/38054_01824c263a4b4684a178fdd9ca580cdf.html
- CONABIO. (2009). *Biodiversidad mexicana*. Obtenido de Biodiversidad mexicana: <http://www.biodiversidad.gob.mx/genes/vargenetica.html>
- CONABIO. (s.f). *Psidium guajava*. México D.F: UNAM.
- Cornuet, P., & et.al. (2014). DIYABC v2.0: a software to make approximate Bayesian computation inferences about population history using single nucleotide polymorphism, DNA sequence and microsatellite data. *PubliMed*, 1187-1189.
- Da Costa, R., & Forni, E. (2006). Chromosome studies in Brazilian species of *Campomanesia Ruiz & Pávon* and *Psidium L.* (Myrtaceae Juss.). *Caryologia*, 59(1), 7-13.
- DeJooode, D., & Wendel, J. (1992). GENETIC DIVERSITY AND ORIGIN OF THE HAWAIIAN. *American Journal of Botany*, 79(11), 1311-1319.
- Dray, S., & et.al. (2017). *Package ade4*. Boston: R thopics.
- Elorrieta, M. (1993). *Caracterización y análisis de la variabilidad genética en poblaciones españolas de tenca*. Genética. Madrid: Universidad complutense de Madrid.

- Eunmi, C. (2002). Evolutionary genetics of invasive species . *TRENDS in ecology and evolution*, 386-392.
- Excoffier, L., & Lisher, H. (2015). *Arlequin 3.5* . Switzerland: Swiss Institute of Bioinformatics .
- Francis, R. (2018). *Pophelper 2.2.6*. United Kingdom: Github.
- Frankham, R. (1997). Do island populations have less genetic variation than mainland populations? *Heredity*, 78, 311-327.
- Galapagos Conservancy. (2018). *Galapagos conservancy organization*. Recuperado el 08 de agosto de 2018, de Galapagos conservancy organization: <http://espanol.galapagos.org/especies-invasoras-control/>
- Garcia-Rossi, D., Rank, N., & Strong, D. (2003). Potential for self-defeating biological control? Variation in herbivore vulnerability among invasive *Spartina* genotypes. *Biological applications*, 13(6), 1640-1649.
- Geoinnova. (2017). *Geoinnova Formación*. Obtenido de https://geoinnova.org/cursos/guia-instalacion-licencia-demo-arcgis-desktop/?gclid=Cj0KCQjw1-fVBRC3ARIsAlifYOOpcZf47cg3f38C8IIUxVnPk08CA8mumMHMeenYcPkB3Sw0_zFVv0aAo8yEALw_wcB
- González, F. (s.f.). *Guía rápida del programa STRUCTURE*. Obtenido de Guía rápida del programa STRUCTURE: http://fernando.gonzalez.unileon.es/web_mex16/guias_rapidas/guia_rapida_STRUCTURE.pdf
- Grupo de ecología y conservación de islas A.C. (2011). *Introducción sobre especies invasoras en islas: conceptos, panorama e impactos negativos*. México D.F: Gobierno de México.
- Guézou, A., Pozo, P., & Buddenhagen, C. (2007). Preventing Establishment: An inventory of introduced plants in Puerto Villamil, Isabela Island, Galápagos. *Plos one*, 1-11.
- Hagenblad, J., & et.al. (2015). Low genetic diversity despite multiple introductions of the invasive plant species *Impatiens glandulifera* in Europe. *BMC Genetics*, 16(103), 2-16.
- Heleno, R., & et.al. (2013). Seed dispersal networks in the Galápagos and the consequences of alien plant invasions. *Proceedings of the royal society*, 280, 1-9.
- Hernández, F., & et.al. (2009). Estructura genética de poblaciones de *Eriocaulon bilobatum*: una especie amenazada de humedales temporales. *Bol.Soc.Bot.Méx.*, 85, 81-88.
- Herrera, M. (2013). *Posibles dispersores de Psidium guajava en la Isla San Cristóbal, Galápagos-Ecuador*. COCIBA. Quito: USFQ.
- Houliston, G., & Goeke, D. (2017). Cortaderia spp. in New Zealand: patterns of genetic variation in two widespread invasive species. *New Zealand Journal of Ecology*, 41(1), 108- 116.
- INSULA. (2005). *Ecosistemas insulares*. UNESCO.
- IPGRI; Cornell University. (2004). *Genética de poblaciones*. Genética. Nueva York: IPGRI.
- Izurieta, A. (2014). *Plan de manejo de las áreas protegidas de Gaápagos para el buen vivir*. Quito: MAE.
- Jaramillo, P., & et.al. (4 de julio de 2017). CDF Checklist of Galapagos flowering plants. *FCD*, 1-326.
- Jombart, T., & et.al. (2010). Package "adegenet". *BMC Genetics*.

- Kalinowski, S. (2005). HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measure of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187-189.
- Kalinowski, S. (s.f.). *HP-Rare*. Obtenido de HP-Rare: <http://www.montana.edu/kalinowski/software/hp-rare.html>
- Kanupriya, P., & et.al. (2011). Cultivar Identification and Genetic Fingerprinting of Guava (*Psidium guajava*) Using Microsatellite. *Fruit Science*, 184-196.
- Kawawa, R., & et.al. (2016). Allelopathic potential of invasive *Psidium guajava*, against selected native tree species in Kakamega tropical forest, western Kenya . *IOSR*, 80-86.
- Key, J. (2004). *Especies invasoras de Galápagos: Malezas meléficas*. New York: HEAR.
- Kindt, r., & Coe, R. (2005). *Package Biodiversity*. Boston: R thopics.
- Lara, R. (s.f). *Los ecosistemas costeros, insulares y epicontinentales*. México D.F: CONABIO.
- Latorre, O. (1997). *Galápagos: Los primeros habitantes de algunas islas* (Vols. 56-57). Quito.
- Le Roux, J., & et.al. (2010). Disentangling the dynamics of invasive fireweed (*Senecio madagascariensis* Poir. species complex) in the Hawaiian Islands. *Biol Invasions*, 2251-2264.
- Le Roux, J., Wieczorek, A., & Meyer, J. (2008). Genetic diversity and structure of the invasive tree *Miconia calvescens* in Pacific islands. *Diversity and Distributions*, 14, 935-948.
- Lorenzano, P. (2008). Bas Van Fraassen y la ley de Hardy-Weinberg. *NEL*, 121-154.
- Luckau, T. (2013). *Openwetware*. Obtenido de Openwetware: https://openwetware.org/wiki/Luckau_Protocols:Scoring
- Lundh, J. (2004). *Galapagos: A Brief History*. Obtenido de Las Encantadas: <http://galapagos.to/index.htm>
- Lundh, J. (2006). THE FARM AREA AND CULTIVATED PLANTS ON SANTA CRUZ, 1932–1965, WITH REMARKS ON OTHER PARTS OF GALAPAGOS. *Research Articles*, 64, 13-27.
- Mack, R., & et.al. (2000). Invasiones biológicas: Causas, epidemiología, consecuencias globales y control. *Tópicos en ecología*, 2-24.
- Maki, M., Yamashiro, T., & Matsumura, S. (2003). High levels of genetic diversity in island populations of the island endemic *Suzukia luchensis*. *Heredity*, 91, 300-306.
- Malkum, R. (2015). Propagación vegetativa . En J. Reyes, & D. García, *Técnicas, métodos y procedimientos de reproducción asexual* (págs. 20-25). Santo Domingo: CEDAF.
- MICSE. (2013). *Proyecto de control y erradicación de especies invasoras prioritarias para la reducción de la vulnerabilidad de especies endémicas y nativas de las islas Galápagos*. Quito: Ministerio del Ambiente.
- Ministerio del ambiente. (2013). *Parque Nacional Galápagos*. Recuperado el 07 de julio de 2018, de Parque Nacional Galápagos: <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-galapagos/#>
- Ministerio del Ambiente. (2018). *MAE*. Obtenido de MAE: <http://www.ambiente.gob.ec/la-nueva-ley-de-galapagos-fortalece-la-conservacion-de-las-islas/>
- Montpellier. (2018). *BOTTLENECK*. Obtenido de BOTTLENECK: <http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/bottleneck.html>

- Morales, A. (2012). *Estadística y probabilidades*. Concepción: Universidad Católica de la Santísima Concepción.
- Moreno, M., & et.al. (2002). Varianza aditiva, heredabilidad y correlaciones en la variedad M1-fitotecnia de tomate de cáscara. *Fitotecnia Mexicana*, 231-237.
- Pacheco, E., & et.al. (2014). Diversidad y estructura genética de accesiones de palma de aceite provenientes de Camerún. *Colombiana de Biotecnología*, XVI(2), 57-67.
- Paradis, E. (2012). *Analysis of phylogenetics and evolution with R*. New York: Springer .
- Parque Nacional de Galápagos. (1998). *Plan de Manejo de conservación y uso sustentable para la reserva marina de Galápagos*. Quito: MAE.
- Paucar, E. (27 de Mayo de 2014). Islas Galápagos: 15 especies han desaparecido. *El Comercio*.
- Peck, S. (1994). *La diversidad de especies de las Galápagos: ¿está en la tierra on el mar?* San Cristóbal : Noticias de Galápagos.
- Pérez, D., & Legaria, J. (2007). Variabilidad genética en cultivares de guayabo. *Fitotecnia Mexicana*, 30(4), 391- 401.
- Pérez, M., & et.al. (2015). Fenología, productividad y calidad de fruto de guayaba pulpa crema y rosa en clima tropical en México. *Interciencia*, 40(3), 2-8.
- Picó, M., & Esteras, C. (2010). *Marcadores moleculares basados en PCR: Marcadores SSR*. Valencia: Universidad politécnica de Valencia.
- Piñero, D., & et.al. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- Piñero, D., & et.al. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *Capital Natural de México*, 415-435.
- Piry, S., Luikart, g., & Cornuet, J. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *journal of heredity*, 90, 502-503.
- Ponce, M. J. (2014). *Estudio preliminar de la diversidad genética de la guayaba, Psidium guajava, en 6 localidades de la isla San Cristóbal, Ecuador*. Quito: USFQ.
- Ponce, S. (2016). *Determinación de la diversidad genética del guayabillo (Psidium galapageium) y comparación con la diversidad genética encontrada en la guayaba (Psidium guajava) en la Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador*. Quito: USFQ.
- Reed, D., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
- Rengifo, N. (2011). *Popuesta de plan de desarrollo turístico de la parroquia Bellavista, Puerto Ayora, Isla Santa Cruz, Provincia de Galápagos*. Quito: UTE.
- Rentería, J. A., & Buddenhagen, C. (2007). *Estrategias para la erradicación de 21 especies de plantas potencialmente invasoras en Galápagos*. Quito: Fundación Charles Darwin.
- Rentería, J., Gardener, M., Panetta, D., Atkinson, R., & Crawly, M. (2012). Possible impacts of the invasive plant *Rubus niveus* on the native vegetation of the Scalesia Forest in the Glapagos Islands. *PLOS ONE*, 1-10.

- Rentería, M. (2000). Breve revisión de los marcadores moleculares. En R. Miroslava, & et.al., *Herramientas moleculares* (págs. 541- 567). México D.F: INECC.
- Rimieri, P. (2013). LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE POBLACIONES DE PLANTAS CONDICIONA LA INTERPRETACIÓN DE PARÁMETROS Y SU ALCANCE EN CARACTERES ECOFISIOLÓGICOS. *BAG*, 24.
- Rocha, P. (2003). Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*, 24(2), 11-26.
- RStudio. (2016). *RStudio*. Obtenido de RStudio: <https://www.rstudio.com/>
- Rue, A. (Enero de 1959). Nacimiento de una isla. *El Correo*, 3-39.
- Saghai-Marooif, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-Length polymorphisms in barley: inheritance, Chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 81, 8014-8018.
- Salamanca, F. (2007). Rearreglos cromosómicos y fusión de genes en tumores sólidos. *Biología molecular y medicina*, 531-535.
- Sanabria, H., & et.al. (2008). *Caracterización molecular con marcadores RAM de árboles nativos de Psidium guajava (guayaba) en el Valle del Cauca*. Bogotá. Palmira: Universidad Nacional de Colombia.
- Sánchez, L. (2006). *Compensación de dosis génica*. Madrid: CIB.
- Schüttler, E., & Karez, C. (2009). *Especies exóticas invasoras en las reservas de biosfera de América Latina y el Caribe*. Montevideo: UNESCO.
- Sim, S.-C. (s.f). *The Structure Software*. Ohio: The Ohio State University.
- Sitther, V., & et.al. (2014). Genetic Characterization of guava (*Psidium guajava*) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genetic resources and Crop Evolution*, 61(4), 829-839.
- Slatkin, M. (1994). *Flujo Génico y Estructura de las Poblaciones*. Evolución. Montevideo: Fcién. Obtenido de <http://evolucion.fcien.edu.uy/Lecturas/Slatkin1994.pdf>
- Sol, D. (2014). Claves del éxito de las especies invasoras. *Ambiente*, 109, 4-13.
- Stuessy, T., & et.al. (2014). Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Linnean Society*, 174, 276-288.
- Thompson, G., & et.al. (2016). Genetic diversity and structure of the globally invasive tree, *Paraserianthes lophantha* subspecies *lophantha*, suggest an introduction history characterised by varying propagule pressure. *Tree Genetics & Genomes*, 12(27), 2-9.
- Tobar, H. (29 de Enero de 2001). El archipiélago de Galápagos y la N/T "Jessica". *El telégrafo*, págs. 10-12.
- Traveset, A., & Santamaría, L. (2004). Alteración de mutualismos planta-animal debido a la introducción de especies exóticas en ecosistemas insulares. *Island Ecology*, 251-276.
- Trujillo, M. (2004). *Principios de Genética Mendeliana*. Michoacan: UMSN.
- Tsutsui, N., Suarez, A., Holway, D., & Case, T. (2000). Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *PNAS*, 97, 11-17.

- Universidad de los Andes. (s.f). *Marcadores moleculares*. Mérida: Departamento de bioinformática.
- Urquía, D. (2018). *Estudio de la diversidad genética de la población de Psidium guajava en la isla Santa Cruz, Galápagos*. Quito: USFQ.
- Valdés, J., & et.al. (2007). Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28(3), 61-67.
- Vries, M. (2011). *Los cuellos de botella y el efecto fundador*. Evolución. California: Universidad de Berkeley.
- Wang, J. (2011). Coancestry: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology*, 11, 141-145.
- Wong, G., & et.al. (2003). *Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética*. Madrid: FAO.
- Yam Tzec, J., Villaseñor, C. R., & Soto, M. (2010). *Una revisión sobre la importancia del fruto de guayaba y sus principales características en la postcosecha* . Texcoco: Universidad Autónoma de Chapingo .
- Yang. (1998). *Hierfstat*. Obtenido de Estimation and tests of Hierarchical F statistics : <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>
- Zerené, M. (2002). *Identificación de marcadores moleculares tipo microsatélites asociados loci genéticos para calidad panadera en trigos de pan* . Santiago de Chile : Universidad de Chile.
- Zirilli, P. (2009). *Análisis de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares en el género Mecardonia*. Buenos Aires: INTA.

12. Tablas:

Tabla 1: 11 pares de primers que resultaron ser polimórficos para *Psidium guajava* en Isabela. Se detalla la secuencia reverse, forward y los motivos.

Locus	Forward	Reverse	Motivos
mPgCIR05	GCCTTTGAACCACATC	TCAATACGAGAGGCAATA	(GA) ₃₁
mPgCIR07	ATGGAGGTAGGTTGATG	CGTAGTAATCGAAGAAATG	(CA) ₁₃ AA(GAA) ₃
mPgCIR08	ACTTTCGGTCTCAACAAG	AGGCTTCCTACAAAAGTG	(GA) ₁₂
mPgCIR09	GCGTGTCGTATTGTTTC	ATTTTCTTCTGCCTTGTC	(GA) ₁₉
mPgCIR10	GTITGGCTCTTATTTTGGT	GCCCCATATCTAGGAAG	(CT) ₁₂
mPgCIR11	TGAAAGACAACAAACGAG	TTACACCCACCTAAATAAGA	(CT) ₁₇
mPgCIR17	CCTTTCGTCATATTCCTT	CATTGGATGGTTGACAT	(CT) ₂₃
mPgCIR18	TAAGCTGCATGTGTGC	ATGGCTTTGGATGAAA	(GA) ₂₃
mPgCIR21	TGCCCTTCTAAGTATAACAG	AGCTACAAACCTTCCTAAA	(AG) ₁₅ GG(AG) ₇
mPgCIR22	CATAAGGACATTTGAGGAA	AATAAGAAAGCGAGCAGA	(GT) ₉ (GA) ₁₄
mPgCIR25	GACAATCCAATCTCACTT	TGTGTCAAGCATACTTTC	(GA) ₂₄

(Kanupriya, et.al; 2011)

Tabla 2: Los 11 pares de marcadores SSRs con su respectivo fluoróforo, temperatura de annealing, el número de alelos encontrados por locus y el rango de tamaño para los alelos.

Locus	Fluoróforos asignados	Temperatura de Annealing	No. Alelos	Tamaño de alelos encontrados
mPgCIR05	VIC	55°C	3	256-266
mPgCIR07	VIC	55°C	5	150-162
mPgCIR08	PET	55°C	5	234-236
mPgCIR09	FAM	55°C	6	170-178
mPgCIR10	VIC	55°C	3	284-324
mPgCIR11	NED	55°C	2	318-320
mPgCIR17	NED	54°C	3	250-260
mPgCIR18	PET	55°C	3	200-204
mPgCIR21	NED	55°C	2	164-168
mPgCIR22	FAM	55°C	6	268-284
mPgCIR25	NED	54°C	2	122-136

Tabla 3: El número de alelos totales y privados obtenidos en las 16 localidades de la Isla Isabela.

Localidades	Número de Alelos	Alelos privados
Cerro Grande	16	0
Cueva de Sucre	18	0
Los Mellizos	15	0
El Ocho	15	0
Barrio Loja	21	1
Finca Ricardo García	24	0
Los Ceibos	26	0
Los Tintos	23	0
El Mango	17	0
Merceditas	19	1
Esperanza	24	0
San Joaquín	21	0
Finca Morocho	14	2
Volcán de Azufre	23	0
El Cura	13	0
Volcán Sierra Negra	26	1

Tabla 4: Número de alelos totales y privados obtenidos en las 7 subpoblaciones formadas a partir de las 16 localidades en Isabela. Así como también el número de alelos y alelos privados corregidos por rarefacción.

Subpoblación	Localidades	Número de Alelos	Alelos correg. por rarefacción	Alelos privados	Alelos privados correg. por rarefacción
Zona del Volcán	Volcán de Azufre, Volcán Sierra Negra	26	25	1	1
El Cura	El Cura	20	24	0	0
Los Mellizos	Los Mellizos	29	18	0	0
Zona Agrícola Centro	Los Ceibos, Cueva de Sucre, San Joaquín	19	23	0	0
ETC	Esperanza, Los Tintos, Cerro Grande	30	19	0	0
Fincas y Lím. Zona Agrícola	Merceditas, Barrio Loja, F. Morocho, F. Ricardo García	25	25	4	2
Zona Puerto Villamil	El Mango, El Ocho	29	28	0	0

Tabla 5: Ho y He de las 16 localidades estudiadas en Isabela y así como los valores de Ho y He para toda la población.

Localidades	Ho	He
Cerro Grande	0,159	0,1676
Cueva de Sucre	0,0454	0,2613
Los Mellizos	0,0921	0,1666
El Ocho	0,2045	0,3551
Barrio Loja	0,0821	0,2096
Finca Ricardo García	0,0454	0,125
Los Ceibos	0,1636	0,2682
Los Tintos	0,04545	0,0369
El Mango	0,1039	0,3094
Merceditas	0,1136	0,1647
Esperanza	0,0909	0,1161
San Joaquin	0,07272	0,1054
Finca Morocho	0,1015	0,2195
Volcán de Azufre	0,2099	0,3491
El Cura	0,0603	0,3672
Volcán Sierra Negra	0,0752	0,2682
Total	0,1041	0,2842

Tabla 6: Ho y He obtenidas para las 7 subpoblaciones en la Isla Isabela, así como el valor global para cada índice.

Subpoblación	Localidades	Ho	He
Zona del Volcán	Volcán de Azufre, Volcán Sierra Negra	0,1308	0,3106
El Cura	El Cura	0,06032	0,3672
Los Mellizos	Los Mellizos	0,0921	0,1666
Zona Agrícola Centro	Los Ceibos, Cueva de Sucre, San Joaquín	0,1105	0,2573
ETC	Esperanza, Los Tintos, Cerro Grande	0,1066	0,1321
Fincas y Lím. Zona Agrícola	Merceditas, Barrio Loja, F. Morocho, F. Ricargo García	0,09048	0,2253
Zona Puerto Villamil	El Mango, El Ocho	0,137	0,3411
Total		0,104	0,2842

Tabla 7: “Fst pairwise” de las 7 subpoblaciones de guayaba en la Isla Isabela. El valor más alto se dio entre ETC y Zona Puerto Villamil (0,14) y el más bajo entre Los Mellizos con Fincas y Lím. Zona Agrícola (0,004).

	Zona del Volcán	El Cura	Los Mellizos	Zona Agrícola Centro	ETC	Fincas y Lím. Zona Agrícola	Zona Puerto Villamil
Zona del Volcán	0						
El Cura	0,02233	0					
Los Mellizos	0,0224	0,0636	0				
Zona Agrícola Centro	0,0179	0,0445	0,0251	0			
ETC	0,0714	0,1197	0,0993	0,06767	0		
Fincas y Lím. Zona Agrícola	0,0271	0,0612	0,0035	0,01754	0,04348	0	
Zona Puerto Villamil	0,0381	0,0356	0,0863	0,04937	0,13384	0,0830	0

Tabla 8: Índices de Wang para evidenciar el nivel de parentesco y endogamia entre las subpoblaciones. Los Mellizos posee niveles de parentesco con ETC (0,196). Fincas y Lím. Zona Agrícola también está emparentada con ETC (0,035). Se vio que entre individuos de la subpoblación perteneciente a Los Mellizos (0,16) y en ETC (0,46) también hay parentesco.

	Zona del Volcán	El Cura	Los Mellizos	Z. Agrícola Centro	ETC	Fincas y Lim. Zona	Z. Puerto Villamil
Zona del Volcán	-0,65661						
El Cura	-0,96764	-1,24568					
Los Mellizos	-0,26799	-0,67337	0,15935				
Z. Agrícola Centro	-0,49239	-0,88396	-0,08896	-0,34339			
ETC	-0,25914	-0,69303	0,19687	-0,0478	0,4636		
Fincas y Lim. Zona	-0,46105	-0,92786	-0,0127	-0,27902	0,03507	-0,22883	
Z. Puerto Villamil	-0,78853	-1,06929	-0,54437	-0,63931	-0,54918	-0,72602	-0,89975

Tabla 9: Prueba realizada en BOTTLENECK demuestra un cuello de botella en la población de guayaba de la Isla Isabela a través del modelo SMM, ya que los valores en deficiencia de heterocigosidad (0,0105) y en la prueba de una cola (0,9919) son mayores que el valor p (0,05).

	Modelo TPM	Modelo SMM
Prueba de una cola: Deficiencia de heterocigosidad	0,06152	0,0105
Prueba de una cola: Exceso de heterocigosidad	0,94922	0,99194
Prueba de dos colas: Deficiencia o exceso de heterocigosidad	0,12305	0,021

Tabla 10: Número de alelos total y de alelos privados para Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal. Estos alelos fueron corregidos por rarefacción.

Isla	Número de Alelos	Alelos correg. por rarefacción	Alelos privados	Alelos privados correg. por rarefacción
Santa Cruz	35	21	8	0
San Cristóbal	25	20	2	0
Isabela	40	22	15	4

Tabla 11: Ho y He para las 3 islas analizadas y los valores globales de los dos índices calculados.

Isla	Ho	He
Santa Cruz	0,1693	0,3647
San Cristóbal	0,2126	0,3566
Isabela	0,1059	0,2842
Total	0,1626	0,3559

Tabla 12: “Fst pairwise” calculado para las 3 islas con el fin de comparar y estimar si existe variación genética procedente de cada población.

	Isabela	Santa Cruz	San Cristóbal
Isabela	0		
Santa Cruz	0,09033	0	
San Cristóbal	0,06905	0,04365	0

13. Figuras:



Figura 1: Individuo GMA1 de *Psidium guajava* de la localidad del El Mango (Latitud: 0°52.348'S, Longitud: 91° 0.324'O) que formó parte del estudio de la Isla Isabela.

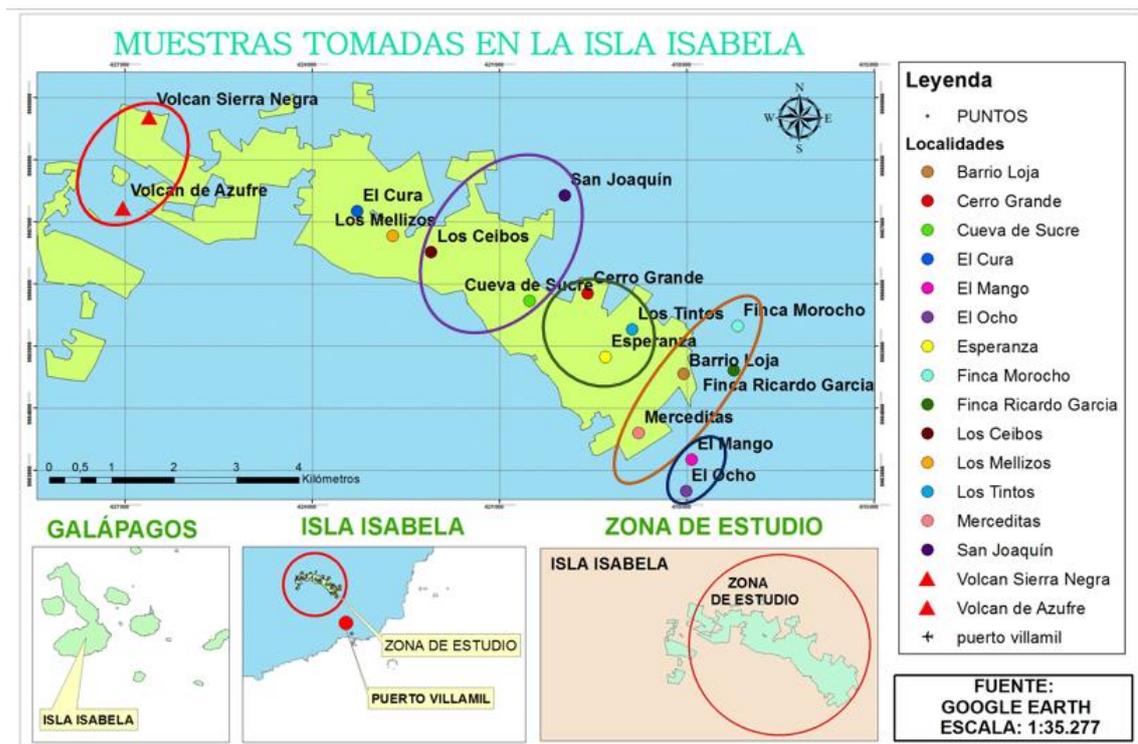


Figura 2: Área de muestreo en la Isla Isabela. Las 16 localidades ubicadas en el mapa, así como las 7 subpoblaciones formadas. 1. Círculo Rojo: Zona del Volcán: Volcán Sierra Negra y Volcán de Azufre, 2. Azul: El Cura, 3. Amarillo: Los Mellizos, 4. C. Morado: Zona Agrícola Centro: Ceibos, Cueva de Sucre y San Joaquín, 5. C. Verde: ETC: Esperanza, Los tintos y Cerro Grande, 6. C. Naranja: Fincas y Límite Zona Agrícola: F. Morocho, F. Ricardo García, Merceditas y Barrio Loja, 6. C. Azul: Zona Puerto Villamil: El Mango y El Ocho.

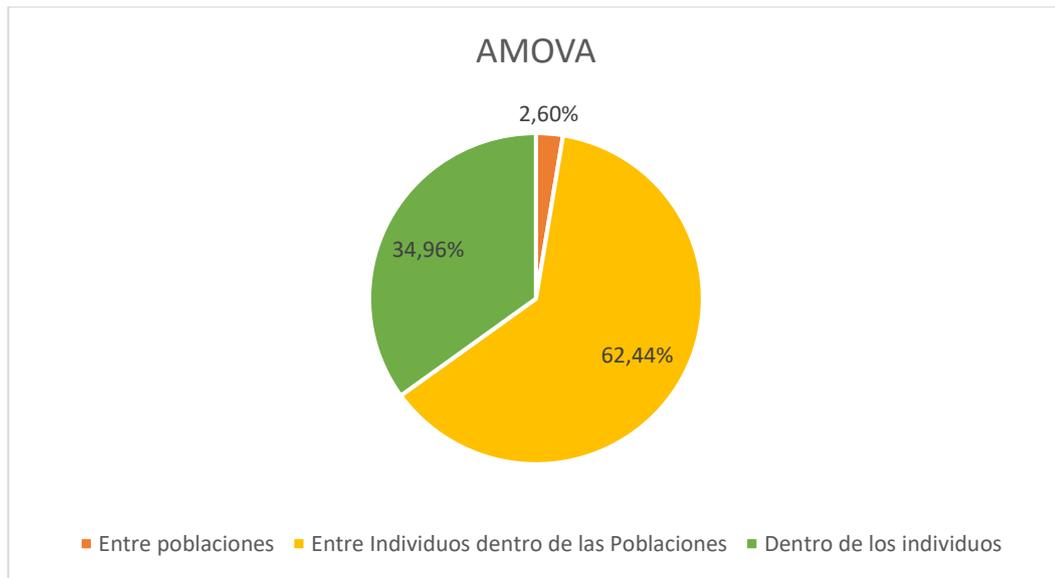


Figura 3: Análisis de Varianza Molecular para los individuos de guayaba en la Isla Isabela. La mayor contribución de la variación proviene de los individuos dentro de las subpoblaciones (62,44%).

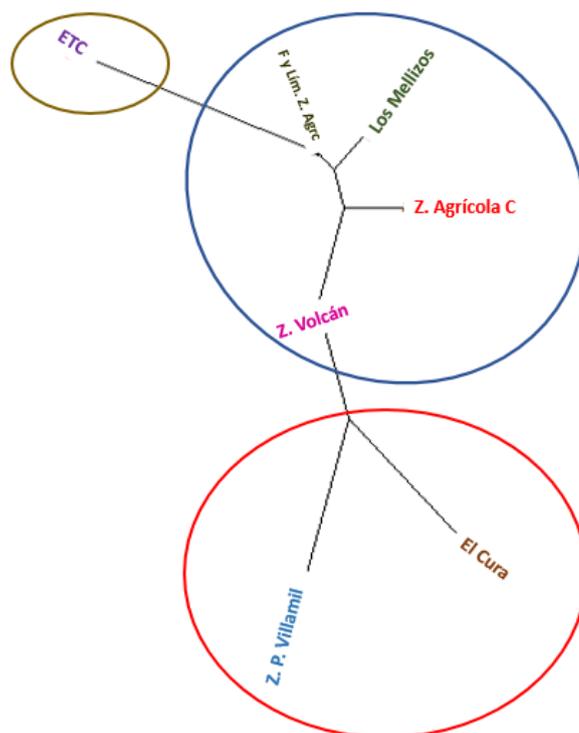


Figura 4: Dendrograma de Neighbor- Joining para las 7 subpoblaciones de guayaba en la Isla Isabela. Los individuos de ETC, Z. P. Villamil y El Cura al parecer poseen mayor distancia genética si se comparan con el resto de subpoblaciones.

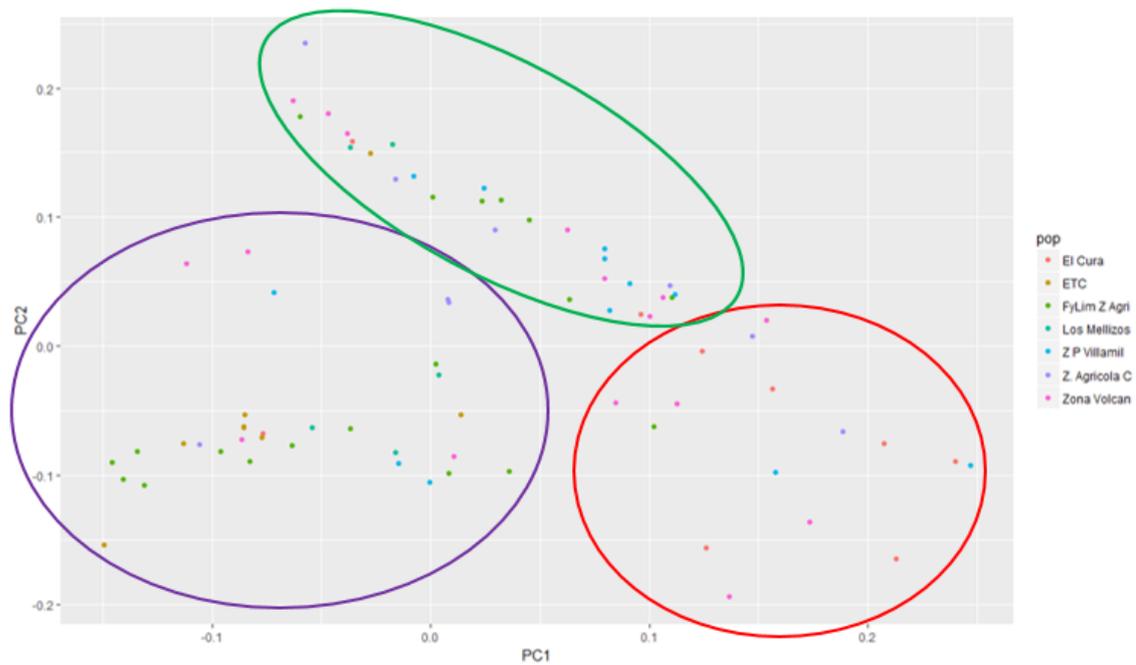


Figura 5: PCoA para todos los individuos de guayaba en la Isla Isabela. Los individuos se encuentran mezclados entre sí, sin embargo se puede observar que posiblemente existan 3 agrupaciones.

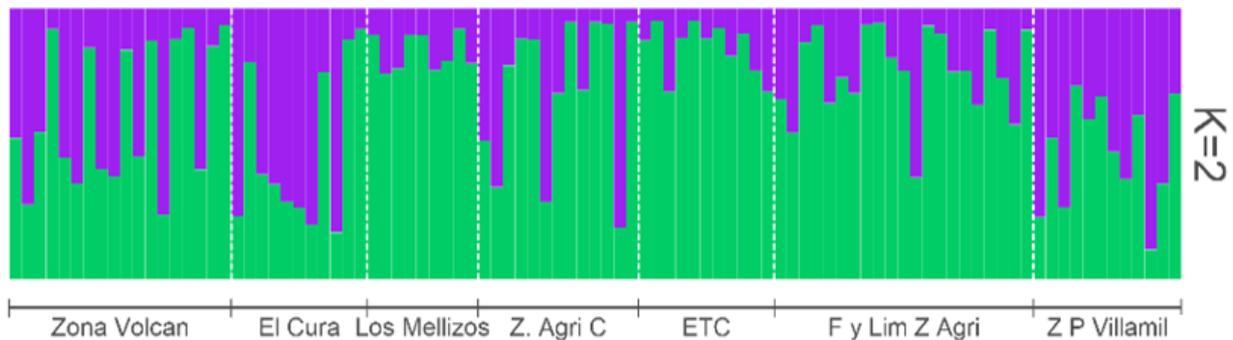


Figura 6: Los resultados obtenidos en STRUCTURE demostraron la contribución de dos linajes (en morado y verde) para todos los individuos en Isabela. El linaje que mayor aporta a la población está en color verde. La presencia de dos linajes aporta con la diferenciación genética presente entre las muestras analizadas.

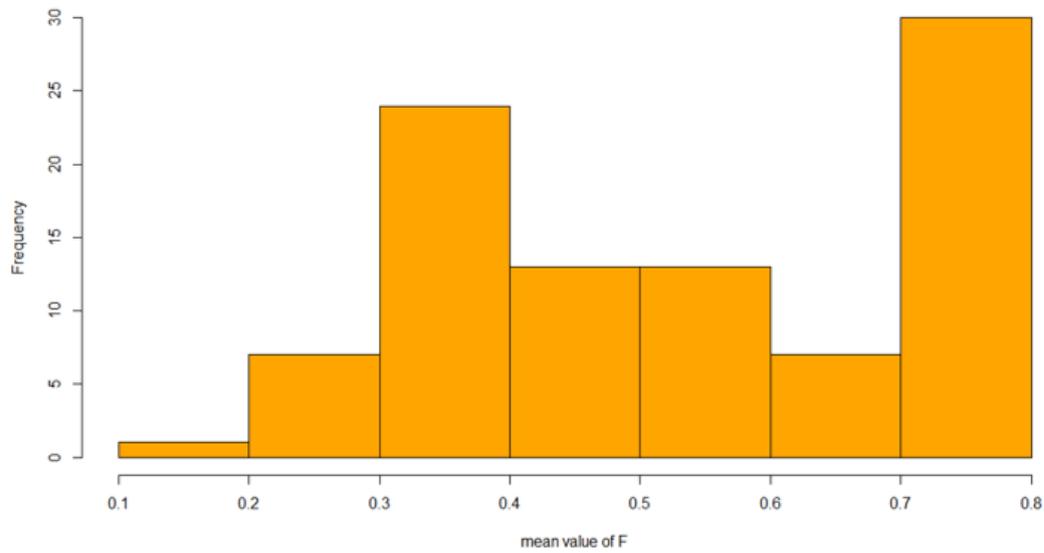


Figura 7: La mayoría de se encuentran en una distribución parecida a la normal, con valores F promedio entre 0,3 a 0,6. Pero existe un cambio abrupto en la distribución debido a la presencia de individuos con valores F promedio entre 0,7 y 0,8 (altas tasas de endogamia).

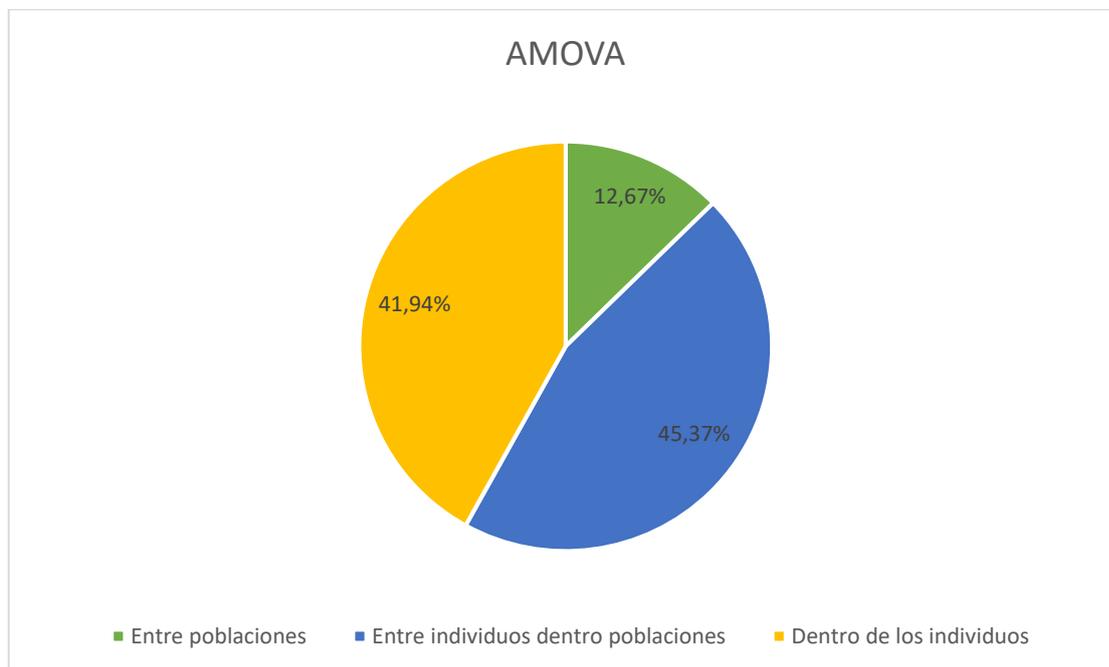


Figura 8: Análisis de Varianza Molecular realizado para las 3 islas (Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal) para determinar de dónde proviene la variación genética, en este caso se encuentra dentro de cada isla (45,37%).

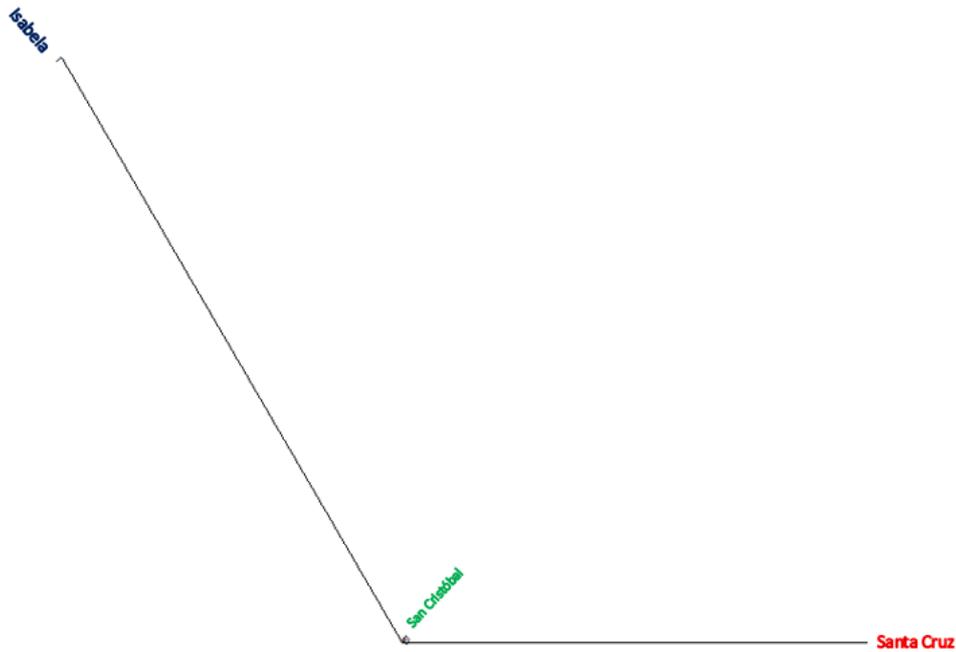


Figura 9: El dendrograma realizado para las poblaciones de las 3 islas determinó que los individuos de la Isla Isabela poseen la mayor distancia genética.

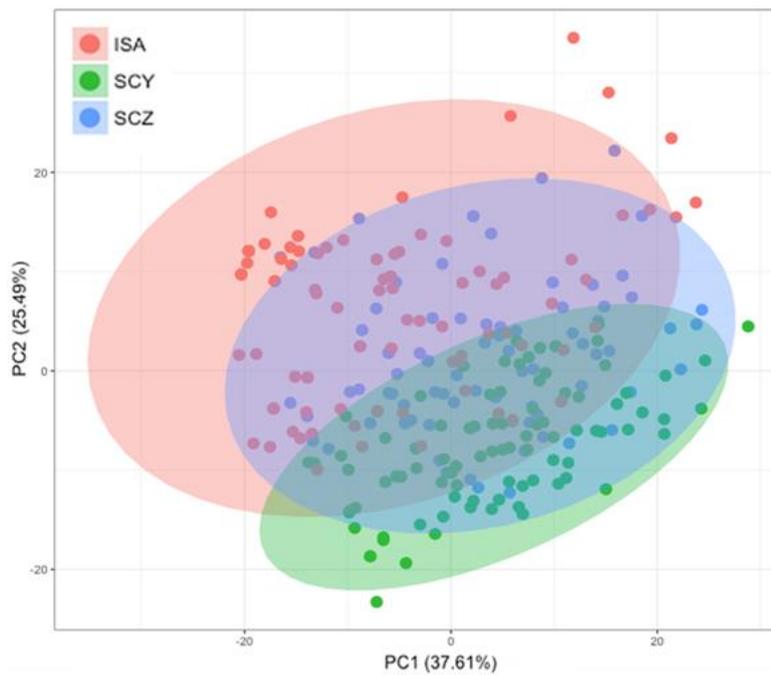


Figura 10: El PCoA muestra la separación de los individuos de acuerdo a su ubicación geográfica. Los individuos de Isabela (ISA) y San Cristóbal (SCY) se encuentran totalmente separados, mientras que los individuos de Santa Cruz (SCZ) se encuentran entre las dos poblaciones mencionadas.

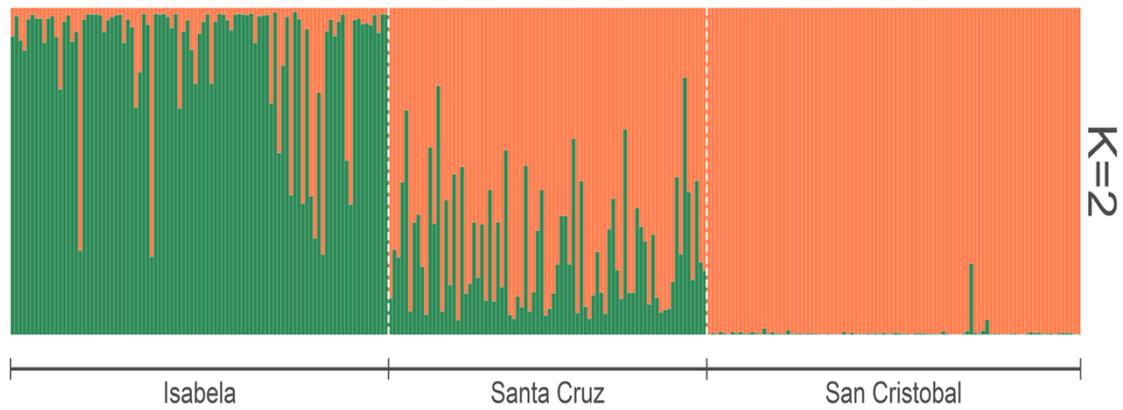


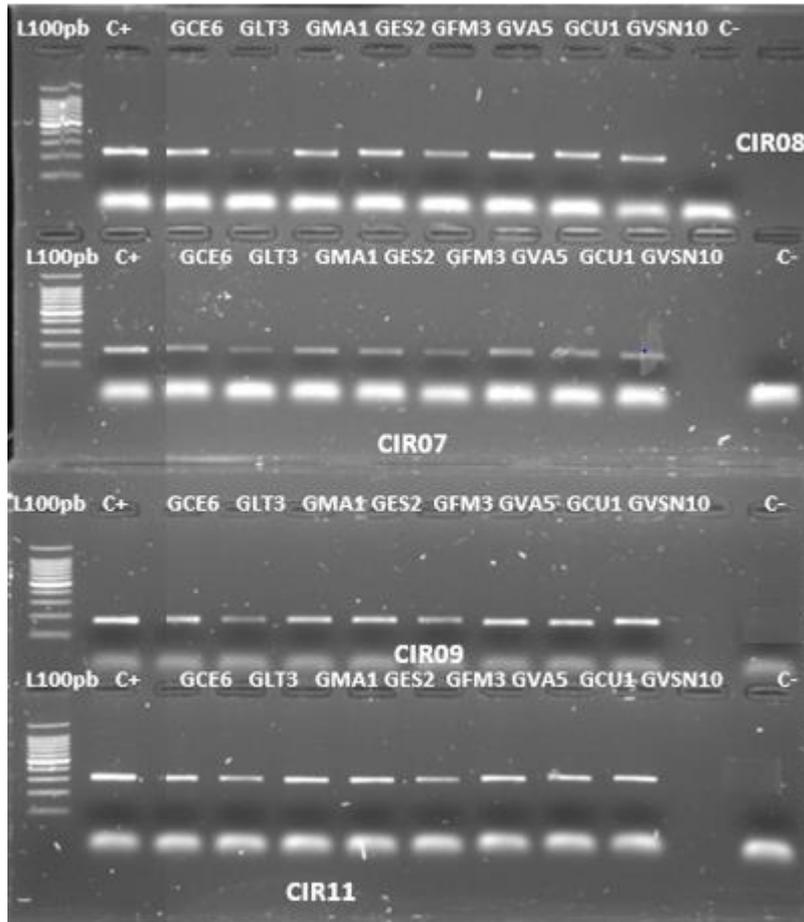
Figura 11: Análisis en STRUCTURE de las poblaciones de cada isla. Las poblaciones de San Cristóbal e Isabela pertenecen a grupos diferentes, mientras que la población de Santa Cruz posee la contribución de los dos linajes con un mayor aporte de San Cristóbal.

14. Anexos:

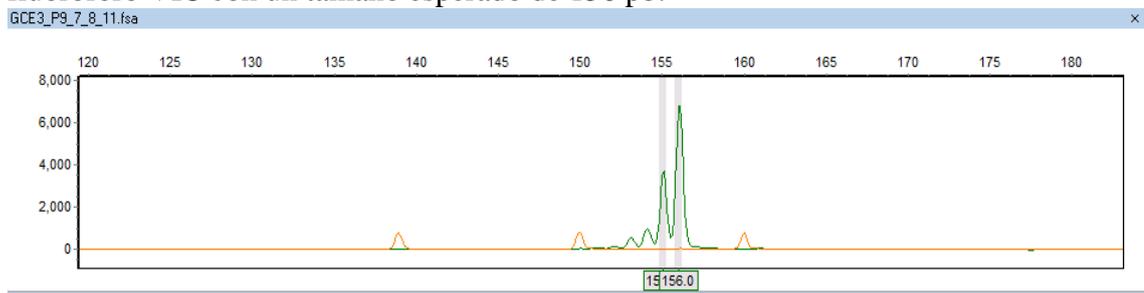
Anexo 1: 95 individuos muestreados en 16 localidades de la Isla Isabela. Cada muestra posee su código, latitud, longitud y altura.

Localidad	Código	Latitud	Longitud	Altura	Localidad	Código	Latitud	Longitud	Altura
El Mango	GMA1	0° 52.348'S	91° 0.324'O	69	Los Mellizos	GLM3	0° 50.155'S	91° 03.178'O	535
El Mango	GMA2	0° 52.432'S	91° 0.378'O	139	Los Mellizos	GLM4	0° 50.020'S	91° 03.304'O	554
El Mango	GMA3	0° 52.542'S	91° 0.457'O	147	Los Mellizos	GLM5	0° 49.519'S	91° 03.303'O	559
El Mango	GMA4	0° 53.002'S	91° 0.497'O	159	Los Mellizos	GLM6	0° 49.536'S	91° 03.181'O	536
El Mango	GMA5	0° 53.072'S	91° 0.518'O	146	Los Mellizos	GLM7	0° 49.571'S	91° 02.576'O	495
El Mango	GMA6	0° 53.133'S	91° 0.433'O	123	Los Mellizos	GLM8	0° 50.090'S	91° 02.380'O	462
El Mango	GMA7	0° 53.172'S	91° 0.353'O	117	Los Mellizos	GLM9	0° 50.313'S	91° 01.345'O	351
El Mango	GMA8	0° 53.212'S	91° 0.25.9'O	119	Barrio Loja	GBL1	0° 52.173'S	91° 00.528'O	182
Merceditas	GME1	0° 52.165'S	91° 0.546'O	225	Barrio Loja	GBL2	0° 52.098'S	91° 00.511'O	196
Merceditas	GME2	0° 52.102'S	91° 01.041'O	217	Barrio Loja	GBL3	0° 51.547'S	91° 00.490'O	207
Merceditas	GME3	0° 52.017'S	91° 01.160'O	248	Barrio Loja	GBL4	0° 51.427'S	91° 00.442'O	212
Merceditas	GME4	0° 52.485'S	91° 01.316'O	294	Barrio Loja	GBL5	0° 51.398'S	91° 00.276'O	185
Esperanza	GES1	0° 51.418'S	91° 01.404'O	301	Barrio Loja	GBL6	0° 51.307'S	91° 00.127'O	169
Esperanza	GES2	0° 51.337'S	91° 01.473'O	327	Barrio Loja	GBL7	0° 51.178'S	91° 00.084'O	174
Esperanza	GES3	0° 51.275'S	91° 01.584'O	339	Barrio Loja	GBL8	0° 51.102'S	91° 00.151'O	194
Los Ceibos	GCE1	0° 51.066'S	91° 02.145'O	395	Barrio Loja	GBL9	0° 51.024'S	91° 00.278'O	218
Los Ceibos	GCE2	0° 51.013'S	91° 02.227'O	409	Barrio Loja	GBL10	0° 50.593'S	91° 00.397'O	252
Los Ceibos	GCE3	0° 50.562'S	91° 02.312'O	413	Finca Ricardo García	GRG1	0° 51.308'S	91° 59.571'O	142
Los Ceibos	GCE4	0° 50.522'S	91° 02.426'O	438	Finca Ricardo García	GRG2	0° 51.275'S	91° 59.592'O	142
Los Ceibos	GCE5	0° 50.503'S	91° 02.522'O	461	Los Tintos	GLT1	0° 51.012'S	91° 00.504'O	277
Los Ceibos	GCE6	0° 50.429'S	91° 03.031'O	490	Los Tintos	GLT2	0° 51.106'S	91° 00.540'O	266
El Cura	GCU1	0° 50.387'S	91° 03.115'O	506	Los Tintos	GLT3	0° 50.568'S	91° 01.048'O	300
El Cura	GCU2	0° 50.475'S	91° 03.270'O	525	Los Tintos	GLT4	0° 50.510'S	91° 01.182'O	333
El Cura	GCU3	0° 50.420'S	91° 03.376'O	525	Cueva de Sucre	GCS1	0° 50.377'S	91° 01.314'O	352
El Cura	GCU4	0° 50.383'S	91° 03.467'O	557	Cueva de Sucre	GCS2	0° 50.315'S	91° 01.343'O	364
El Cura	GCU5	0° 50.375'S	91° 03.578'O	581	Volcan de Azufre	GVA1	0° 50.126'S	91° 05.294'O	879
El Cura	GCU6	0° 50.364'S	91° 04.082'O	606	Volcan de Azufre	GVA2	0° 50.114'S	91° 05.362'O	903
El Cura	GCU7	0° 50.342'S	91° 04.172'O	622	Volcan de Azufre	GVA3	0° 50.118'S	91° 05.437'O	937
El Cura	GCU8	0° 50.315'S	91° 04.290'O	656	Volcan de Azufre	GVA4	0° 50.136'S	91° 05.526'O	960
El Cura	GCU9	0° 50.286'S	91° 04.375'O	677	Volcan de Azufre	GVA5	0° 50.133'S	91° 06.004'O	998
El Cura	GCU10	0° 50.196'S	91° 04.408'O	712	Volcan de Azufre	GVA6	0° 50.170'S	91° 06.070'O	1019
El Cura	GCU11	0° 50.169'S	91° 04.075'O	806	Volcan de Azufre	GVA7	0° 50.198'S	91° 06.133'O	1024
Volcan Sierra Negra	GVSN1	0° 50.099'S	91° 05.246'O	877	Cerro Grande	CGC1	0° 50.553'S	91° 00.459'O	288
Volcan Sierra Negra	GVSN2	0° 50.032'S	91° 05.235'O	888	Cerro Grande	GCG2	0° 50.425'S	91° 00.452'O	287
Volcan Sierra Negra	GVSN3	0° 49.528'S	91° 05.218'O	924	Cerro Grande	GCG3	0° 49.510'S	91° 00.217'O	258
Volcan Sierra Negra	GVSN4	0° 49.438'S	91° 05.210'O	940	Cerro Grande	GCG4	0° 49.516'S	91° 00.143'O	253
Volcan Sierra Negra	GVSN5	0° 49.359'S	91° 05.229'O	965	San Joaquín	GSJ1	0° 49.131'S	91° 01.332'O	385
Volcan Sierra Negra	GVSN6	0° 49.283'S	91° 05.217'O	970	San Joaquín	GSJ2	0° 49.134'S	91° 01.307'O	381
Volcan Sierra Negra	GVSN7	0° 49.180'S	91° 05.177'O	974	San Joaquín	GSJ3	0° 49.109'S	91° 01.327'O	382
Volcan Sierra Negra	GVSN8	0° 49.106'S	91° 05.165'O	985	San Joaquín	GSJ4	0° 49.061'S	91° 01.305'O	375
Volcan Sierra Negra	GVSN9	0° 48.572'S	91° 05.167'O	988	San Joaquín	GSJ5	0° 49.143'S	91° 01.303'O	382
Volcan Sierra Negra	GVSN10	0° 48.482'S	91° 05.152'O	987	Finca Morocho	GFM1	0° 51.302'S	90° 59.564'O	136
Volcan Sierra Negra	GVSN11	0° 48.411'S	91° 05.140'O	983	Finca Morocho	GFM2	0° 51.240'S	90° 59.505'O	128
Los Mellizos	GLM1	0° 50.372'S	91° 03.102'O	498	Finca Morocho	GFM3	0° 51.165'S	90° 59.467'O	130
Los Mellizos	GLM2	0° 50.268'S	91° 03.150'O	521	Finca Morocho	GFM4	0° 51.074'S	90° 59.440'O	136
					Finca Morocho	GFM5	0° 50.583'S	90° 59.464'O	157
					Finca Morocho	GFM6	0° 51.258'S	91° 00.013'O	152
					El Ocho	GEO1	0° 53.102'S	90° 00.177'O	110
					El Ocho	GEO2	0° 53.174'S	90° 00.189'O	104
					El Ocho	GEO3	0° 53.287'S	90° 00.156'O	94
					El Ocho	GEO4	0° 53.410'S	90° 00.105'O	81

Anexo 2: Electroforesis en geles de agarosa al 1,5% para observar la amplificación de bandas de acuerdo al tamaño esperado por locus. Se puede observar la amplificación de los primers Cir08, cir07 y Cir09 con muestras de guayaba pertenecientes a diferentes localidades de Isabela.



Anexo 3: Genotipado de la muestra GCE3 en GenMarker con el primer Cir07 con fluoróforo VIC con un tamaño esperado de 156 pb.



Anexo 4: Matriz de genotipado de los 95 individuos analizados en el estudio. Se presentan los alelos encontrados para cada par de primer (11 loci).

	pop	CIR10	CIR07	CIR05	CIR17	CIR08	CIR11	CIR18	CIR21	CIR09	CIR22	CIR25
GCG1	Pop1	284/284	156/156	262/264	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCG2	Pop1	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCG3	Pop1	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	202/204	166/166	170/178	284/284	136/136
GCG4	Pop1	284/284	162/162	262/264	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCS1	Pop2	284/284	156/156	264/264	250/250	236/236	318/318	202/202	166/166	170/178	284/284	122/122
GCS2	Pop2	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLM1	Pop3	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	280/284	136/136
GLM2	Pop3	284/284	156/156	264/266	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	170/178	284/284	136/136
GLM3	Pop3	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/170	284/284	136/136
GLM4	Pop3	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	280/284	136/136
GLM5	Pop3	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLM6	Pop3	284/284	156/162	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/178	284/284	136/136
GLM7	Pop3	284/284	156/156	264/264	246/246	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLM8	Pop3	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLM9	Pop3	284/284	156/156	NA	258/258	236/236	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GEO1	Pop4	284/324	160/160	262/264	258/258	234/236	318/318	200/202	166/166	170/178	284/284	136/136
GEO2	Pop4	284/284	162/162	266/266	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GEO3	Pop4	320/320	156/156	264/264	246/246	234/234	318/320	202/202	168/168	178/178	284/284	136/136
GEO4	Pop4	284/284	156/156	264/266	258/258	234/234	318/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GBL1	Pop5	284/284	156/156	264/264	252/252	234/236	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GBL2	Pop5	NA	NA	264/264	NA	236/236	NA	204/204	166/166	178/178	286/288	136/136
GBL4	Pop5	284/284	156/156	264/264	258/258	234/236	320/320	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GBL5	Pop5	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GBL6	Pop5	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	200/202	166/166	170/178	284/284	136/136
GBL7	Pop5	284/284	156/162	264/264	258/258	234/234	318/318	NA	166/166	178/178	280/280	136/136
GBL8	Pop5	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	200/200	166/166	170/170	284/284	136/136
GBL9	Pop5	284/284	156/156	264/264	NA	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GBL10	Pop5	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GRG1	Pop6	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/170	284/284	136/136
GRG2	Pop6	284/284	160/160	264/264	258/258	234/234	318/318	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCE1	Pop7	284/284	156/156	NA	258/258	234/236	318/318	202/204	166/166	170/178	284/284	122/136
GCE2	Pop7	284/284	162/162	264/264	250/250	234/234	318/318	202/204	164/166	178/178	284/284	136/136
GCE3	Pop7	284/284	156/156	264/264	246/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	280/284	136/136
GCE4	Pop7	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	200/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCE5	Pop7	284/284	NA	264/264	258/258	234/234	318/318	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GCE6	Pop7	284/284	162/162	262/262	246/246	234/234	318/318	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLT1	Pop8	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	282/284	136/136
GLT2	Pop8	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GLT3	Pop8	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/286	136/136
GLT4	Pop8	284/284	156/156	NA	258/258	NA	320/320	NA	166/166	NA	284/284	NA
GMA1	Pop9	284/284	156/156	264/264	NA	234/234	318/318	202/204	166/166	178/178	268/284	136/136
GMA2	Pop9	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	122/122
GMA3	Pop9	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	200/200	168/168	178/178	284/284	136/136
GMA4	Pop9	284/284	160/160	264/264	258/258	234/234	318/318	202/202	166/166	170/178	284/284	136/136
GMA5	Pop9	284/284	156/156	264/264	258/258	234/236	320/320	202/202	166/166	170/178	284/284	136/136
GMA6	Pop9	284/320	156/166	256/256	250/250	234/234	318/318	202/202	166/166	170/170	284/284	122/122
GMA7	Pop9	284/284	162/162	264/264	258/260	234/234	318/318	202/202	166/166	178/178	284/284	136/136
GMA8	Pop9	284/284	162/162	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GME1	Pop10	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GME2	Pop10	284/284	156/162	264/264	252/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	122/136
GME3	Pop10	320/320	156/156	264/264	256/258	234/236	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GME4	Pop10	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GES1	Pop11	284/284	156/166	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GES2	Pop11	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GES3	Pop11	284/284	156/156	264/264	258/258	234/236	320/320	202/202	166/166	170/178	284/284	136/136
GSJ1	Pop12	284/284	160/160	262/264	258/258	234/234	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GSJ2	Pop12	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GSJ3	Pop12	284/284	160/160	264/264	258/258	234/234	318/320	204/204	166/166	178/178	282/284	136/136
GSJ4	Pop12	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GSJ5	Pop12	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GFM1	Pop13	284/284	156/156	264/264	252/258	234/236	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GFM2	Pop13	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/170	284/284	136/136

GFM2	Pop13	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/170	284/284	136/136
GFM3	Pop13	284/284	154/154	264/264	250/250	234/234	318/318	202/204	166/166	178/178	282/284	136/136
GFM4	Pop13	NA	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GFM5	Pop13	284/284	156/156	264/264	NA	234/234	320/320	NA	166/166	178/178	280/284	136/136
GFM6	Pop13	NA	156/156	264/264	258/258	246/246	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVA1	Pop14	284/284	156/156	NA	250/250	234/236	320/320	204/204	166/166	178/178	NA	122/122
GVA2	Pop14	284/284	156/162	264/264	250/258	234/246	318/318	202/202	164/166	178/178	268/284	136/136
GVA3	Pop14	284/284	156/156	264/264	252/258	234/234	320/320	202/202	166/168	170/178	284/284	136/136
GVA4	Pop14	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVA5	Pop14	284/284	156/162	264/264	258/258	234/234	318/318	202/204	166/168	170/170	284/284	136/136
GVA6	Pop14	324/324	156/156	264/264	252/252	236/236	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	122/122
GVA7	Pop14	284/284	156/162	264/264	258/258	234/234	318/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCU1	Pop15	284/284	156/156	264/264	NA	246/246	318/318	204/204	168/168	170/170	284/284	122/122
GCU2	Pop15	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	170/178	284/284	136/136
GCU3	Pop15	284/284	156/156	NA	246/246	234/234	320/320	202/202	164/164	178/178	284/284	136/136
GCU4	Pop15	284/284	156/156	262/262	246/246	234/234	318/318	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GCU5	Pop15	320/320	156/156	NA	258/258	234/236	318/318	202/204	166/166	170/178	284/284	122/122
GCU6	Pop15	284/284	156/156	262/262	246/246	234/234	318/318	202/202	166/166	178/178	284/284	136/136
GCU7	Pop15	284/284	156/156	NA	258/258	236/236	318/318	202/202	166/166	170/170	284/284	122/122
GCU8	Pop15	284/284	156/156	264/264	258/260	234/234	320/320	202/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCU9	Pop15	284/320	166/166	256/256	250/250	234/234	320/320	202/202	166/166	170/170	284/284	136/136
GCU10	Pop15	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GCU11	Pop15	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN1	Pop16	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/320	202/202	168/168	170/170	280/284	136/136
GVSN2	Pop16	284/284	156/156	264/264	246/258	234/234	318/318	202/202	168/168	178/178	280/284	136/136
GVSN3	Pop16	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	NA	166/166	178/178	280/284	136/136
GVSN4	Pop16	284/324	156/156	264/264	258/258	234/234	318/320	NA	166/166	170/170	284/284	122/122
GVSN5	Pop16	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	318/318	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN6	Pop16	284/284	166/166	264/264	250/250	234/234	318/318	NA	166/166	170/170	284/284	136/136
GVSN7	Pop16	284/284	156/156	264/264	NA	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN8	Pop16	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	NA	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN9	Pop16	284/284	166/166	262/264	250/250	234/234	318/318	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN10	Pop16	284/284	156/156	252/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136
GVSN11	Pop16	284/284	156/156	264/264	258/258	234/234	320/320	204/204	166/166	178/178	284/284	136/136

Anexo 5: Cuantificación de las muestras de *P. guajava* de la Isla Isabela.

#	Muestra	ng/ul	#	Muestra	ng/ul
1	GVA1	1388	47	GSJ1	390,9
2	GVA2	5125,1	48	GSJ2	555
3	GVA3	577,6	49	GSJ3	845
4	GVA4	259,2	50	GSJ4	388,3
5	GVA5	1457,3	51	GSJ5	388,9
6	GVA6	774,2	52	GES1	418,6
7	GVA7	525,8	53	GES2	700,6
8	GVSN1	269,8	54	GES3	1257,3
9	GVSN2	440	55	GLT1	262,4
10	GVSN3	141,8	56	GLT2	429,1
11	GVSN4	605,4	57	GLT3	1427,3
12	GVSN5	472,7	58	GLT4	1439,8
13	GVSN6	754,8	59	GCG1	159,5
14	GVSN7	393,1	60	GCG2	489
15	GVSN8	64,3	61	GCG3	315,9
16	GVSN9	83,2	62	GCG4	236
17	GVSN10	923,7	63	GME1	45
18	GVSN11	149,6	64	GME2	261,2
19	GCU1	1763,5	65	GME3	494,7
20	GCU2	24,4	66	GME4	520
21	GCU3	489,7	67	GBL1	440,2
22	GCU4	72,6	68	GBL2	1094,4
23	GCU5	470	69	GBL4	266,1
24	GCU6	552,1	70	GBL5	178,5
25	GCU7	1025,2	71	GBL6	233
26	GCU8	50,4	72	GBL7	1884,9
27	GCU9	280	73	GBL8	652,3
28	GCU10	118,9	74	GBL9	1662,1
29	GCU11	142,1	75	GBL10	345,3
30	GLM1	426,6	76	GRG1	288,5
31	GLM2	312,3	77	GRG2	209,1
32	GLM3	2123,7	78	GFM1	522,3
33	GLM4	443,9	79	GFM2	399,8
34	GLM5	540,9	80	GFM3	1175,2
35	GLM6	512,3	81	GFM4	276,9
36	GLM7	914	82	GFM5	1324,6
37	GLM8	139,3	83	GFM6	1557
38	GLM9	1209,8	84	GMA1	1439,8
39	GCE1	521,4	85	GMA2	534,2
40	GCE2	810,6	86	GMA3	614,9
41	GCE3	590,6	87	GMA4	304,9
42	GCE4	263,3	88	GMA5	317,5
43	GCE5	165,2	89	GMA6	558
44	GCE6	1167,9	90	GMA7	1528,9
45	GCS1	306,5	91	GMA8	1635,6
46	GCS2	3652,1	92	GEO1	150,5
			93	GEO2	130,8
			94	GEO3	120
			95	GEO4	147,9