

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Estandarización de Primers Específicos y Análisis de  
Diversidad Genética de *Psidium galapageium* en la isla  
Santa Cruz, Galápagos**

**Proyecto de Investigación**

**Andrea Michelle Soria Puente**  
**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

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

Quito, 7 de mayo del 2018

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO  
USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Estandarización de Primers Específicos y Análisis de Diversidad  
Genética de *Psidium galapageium* en la isla Santa Cruz, Galápagos**

**Andrea Michelle Soria Puente**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph. D.

Firma del profesor:

\_\_\_\_\_

Quito, 7 de mayo del 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: Andrea Michelle Soria Puente

Código: 00111351

Cédula de Identidad: 1723063218

Lugar y fecha: Quito, 7 de mayo del 2018

## **DEDICATORIA**

Dedico este trabajo a Dios por ser mi roca y mi fortaleza en cada momento de mi vida y a mis padres quienes han sido mi apoyo constante a lo largo de todos estos años de estudio.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por ser mi refugio, mi fortaleza y mi ayuda constante. Por ser mi Padre celestial que está siempre a mi lado y me ayuda a cumplir mis sueños.

A mis padres, porque siempre han confiado en mí y me han brindado su amor, su apoyo, su paciencia y su cariño para seguir luchando por alcanzar mis metas y no rendirme aún en los momentos más difíciles.

A David, por ser el amor de mi vida, por su paciencia, por siempre apoyarme y brindarme sus palabras de aliento cuando más las necesitaba.

A mi abuelita, mi mamita Marujita, por sus sabios consejos, por su amor infinito y por siempre estar conmigo a lo largo de toda mi vida.

A mi familia, principalmente a Dayán, Ely, Margarita porque siempre han estado dispuestas a ayudarme cuando más las he necesitado.

A María de Lourdes Torres, directora de este proyecto, por su paciencia, apoyo, confianza y por brindarme su ayuda en la realización de este proyecto.

A Jennifer Rowntree por su ayuda en el diseño de los primers microsátélites para *P.galapageium*.

A GAIAS-Grant por el financiamiento de este proyecto.

A Leo Zurita por su ayuda en la elaboración del mapa de recolección de *P.galapageium*.

A Majo Pozo y Bernardo Gutierrez por su valiosa ayuda, su guía y su apoyo desde el inicio del proyecto.

A Marcelo Loyola y Heinke Jäger por su apoyo y consejos en la fase de recolección de muestras.

A los miembros del comité: Andrés Torres, Gabriela Pozo y Hugo Valdebenito por su paciencia, apoyo y valiosa guía durante la realización de este proyecto.

A todos los chicos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, principalmente a Nina, Diego, Andre A., Darío, Carito C., Ricky, Michu y Dani gracias por su apoyo y su amistad.

A mis amigas y amigos por todas las aventuras y la amistad cultivada durante todos estos años de carrera

## RESUMEN

Las islas Galápagos son consideradas como un laboratorio natural dinámico debido a la biodiversidad única que presentan. La gran cantidad de especies endémicas de fauna y flora son de gran interés para estudios evolutivos. Sin embargo, un problema importante que afecta a estas islas es el incremento de especies introducidas, las cuales ponen en riesgo a las especies endémicas. El guayabillo (*Psidium galapageium*) es una especie endémica de las Islas Galápagos, catalogada como amenazada y una posible causa podría ser la introducción de otras plantas que estarían afectando el bienestar de la especie endémica. La guayaba (*Psidium guajava*), es una especie invasora congénere del guayabillo caracterizada por ser de fácil dispersión, lo que le permite habitar diversos ambientes y ecosistemas, afectando posiblemente a especies endémicas como *Psidium galapageium*. La diversidad genética es una herramienta utilizada para conocer la variación de genes dentro y entre especies, así como conocer la situación actual en la que se encuentra una especie. Mediante el uso de marcadores moleculares se busca determinar el nivel de variabilidad genética dentro de una especie analizando regiones específicas dentro de su genoma. En el presente estudio se utilizaron marcadores microsatélites (SSR) específicos para *Psidium galapageium*, los cuales se caracterizan por ser altamente polimórficos, reproducibles y fáciles de analizar. Para visualizar y analizar a mayor escala la diversidad genética de *P. galapageium* en este estudio, se agruparon a los 87 individuos de las 17 localidades de la Isla Santa Cruz en 6 subpoblaciones, cada subpoblación contiene a las localidades más cercanas que se encuentran aproximadamente a 2 km entre sí. Estas subpoblaciones fueron Norte, Noroeste, Noreste, Este, Sur Centro y Suroeste. En base a los resultados obtenidos en este estudio, *P. galapageium* de la Isla Santa Cruz presenta una diversidad genética moderadamente alta ( $H_e=0.618$ ) y de acuerdo con el análisis de variación molecular (AMOVA) el 94.73% de esta variación se encuentra dentro de las subpoblaciones y un 5.27% entre las subpoblaciones. Con relación a los valores de  $F_{st}$ , se obtuvo una baja diferenciación genética y un alto flujo génico entre los individuos analizados. Los resultados de PCoA y el dendrograma de distancias genéticas sugieren que los individuos de la subpoblación del Noreste se encuentran genéticamente más distantes de los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Suroeste. Finalmente, de acuerdo a los análisis de STRUCTURE realizados, se obtuvo un K óptimo de 2, lo cual sugiere la contribución de dos acervos genéticos en los individuos muestreados. Sin embargo, no se observa una estructura poblacional totalmente definida de *P. galapageium* en la isla Santa Cruz. Es necesario realizar más estudios de biología reproductiva e historia evolutiva de esta especie para entender mejor el estado de esta especie en esta isla. Este estudio reporta por primera vez el diseño y estandarización de primers microsatélites (SSR) específicos para *P. galapageium*, los cuales son una herramienta valiosa para analizar la diversidad genética de esta planta endémica en las islas Galápagos.

Palabras clave: *Psidium galapageium*, microsatélites, especies endémicas, diversidad genética, especies introducidas, Islas Galápagos

## ABSTRACT

The Galapagos Islands are considered a dynamic natural laboratory because of their unique biodiversity. The high amount of endemic flora and fauna species are of interest for evolutionary studies. However, a significant problem that is affecting the islands is the increasing amount of introduced species, which can become a threat to native species. Guayabillo (*Psidium galapageium*) is found solely in the Galapagos Islands. It is currently considered to be a threatened species, possibly due to the introduction of invasive plants that are affecting its fitness. Guava (*Psidium guajava*) is an introduced species closely related to guayabillo, and it is known to have a high dispersion potential that facilitates the invasion of different environments and ecosystems, affecting endemic species such as *P. galapageium*. Genetic diversity is a very helpful tool for understanding the current situation and genetic variation within and among species. Molecular markers are useful for studying genetic variability within species as they analyze specific regions within the genome. In this study, the genetic diversity of *P. galapageium* from Santa Cruz island was analyzed with specific microsatellites markers (SSRs) that are highly polymorphic, replicable and easy to analyze. For the analysis of the genetic diversity of *Psidium galapageium*, 87 guayabillo individuals collected from 17 sites on Santa Cruz Island were grouped into 6 subpopulations based on the proximity of the sites. These subpopulations were named: North, Northwest, Northeast, East, South Central and Southwest. The results obtained in this study indicate that *P.galapageium* on Santa Cruz Island has a moderately high genetic diversity ( $H_e=0.618$ ). According to the Analysis of Molecular Variance (AMOVA), 94.73% of the genetic variability is located within subpopulations and 5.27% is located among subpopulations. The  $F_{st}$  values obtained indicate a low genetic differentiation and high gene flow between individuals. The PCoA and the genetic distance dendrogram suggest that individuals from the Northeast subpopulation are more genetically distant to individuals from the Northwest and Southwest subpopulations. Finally, according to analysis using STRUCTURE software, the optimal K value is 2, suggesting the contribution of two ancestral lineages in the sampled individuals. However, there is no well-defined population structure for *P. galapageium* on Santa Cruz Island. Further reproductive and evolutionary studies of *P. galapageium* are necessary to understand the state of this species. This study reports, for the first time, the design and standardization of microsatellite markers for *P. galapageium*, a useful tool for genetic diversity analyses of this endemic plant in the Galapagos Islands.

**Key words:** *Psidium galapageium*, microsatellites, endemic species, genetic diversity, invasive species, Galapagos Islands.

## TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	7
TABLA DE CONTENIDO.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ÍNDICE DE FIGURAS.....	11
ANEXOS.....	12
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Especie en Estudio.....	13
1.1.1 Importancia de <i>Psidium galapageium</i> .....	14
1.2 Islas Galápagos.....	16
1.3 La Amenaza de las Especies Invasoras a Especies Endémicas.....	19
1.4 Diversidad Genética y Biológica.....	22
1.5 Marcadores Moleculares.....	23
1.6 Marcadores Microsatélites.....	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo General.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. ÁREA DE ESTUDIO.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. MATERIALES.....	30
5.1. Material Vegetal.....	30
5.2 Extracción de ADN.....	31
5.3 Cuantificación y dilución de ADN.....	31
5.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	31
5.5 Amplificación de regiones microsatélites mediante PCR.....	31
5.6. Genotipado Placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems ®).....	32
5.7. Análisis de datos.....	32
6. MÉTODOS.....	32

6.1	Recolección de muestras de <i>P. galapageium</i> en la isla Santa Cruz .....	32
6.2	Extracción de ADN .....	33
6.3	Preparación de Muestras:.....	34
6.4	Diseño de primers específicos para <i>P.galapageium</i> .....	34
6.5	Estandarización de primers específicos para <i>P. galapageium</i> .....	35
6.6	Amplificación con 15 primers específicos para <i>P.galapageium</i> .....	36
6.7	Genotipado de los individuos de <i>P.galapageium</i> amplificados .....	37
6.8	Análisis de datos .....	38
7.	RESULTADOS .....	41
7.1	Extracción de muestras y cuantificación .....	41
7.2	Diseño de primers específicos para <i>P.galapageium</i> .....	41
7.3	Estandarización y amplificación con primers específicos para <i>P. galapageium</i> .....	41
7.4	Análisis de Datos: .....	43
7.4.1	Diversidad genética .....	43
7.4.2	Agrupamiento de los individuos de acuerdo a su diversidad genética .....	45
7.4.3	Análisis de Estructura poblacional .....	47
7.4.4	Análisis de Endogamia y Parentesco.....	47
8.	DISCUSIÓN.....	49
8.1	Diseño y amplificación con primers microsatélites específicos para <i>P. galapageium</i> .....	49
8.2	Análisis de datos .....	50
8.2.1	Diversidad alélica de <i>P.galapageium</i> .....	50
8.2.2	Diversidad genética de <i>P. galapageium</i> .....	51
8.2.3	Flujo génico de <i>Psidium galapageium</i> en la isla Santa Cruz .....	55
8.2.4	Agrupamiento de los individuos de acuerdo a su diversidad genética .....	57
8.2.5	Estructura poblacional de <i>P.galapageium</i> .....	59
8.2.6	Efecto de las fuerzas evolutivas en la población de <i>P.galapageium</i> en Isla Santa Cruz .....	62
9.	CONCLUSIONES .....	66
10.	RECOMENDACIONES.....	67
11.	BIBLIOGRAFÍA .....	68

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Localidades de la isla Santa Cruz agrupadas en subpoblaciones siguiendo el criterio de las subpoblaciones realizadas por Urquía, (2017).....	79
<b>Tabla 2.</b> 15 marcadores microsatélites seleccionados junto con las secuencias forward y reverse, temperatura de <i>annealing</i> estandarizada, fluoróforo utilizado, tamaño esperado de fragmento y valores PIC. ....	79
<b>Tabla 3 .</b> Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de <i>P. galapageium</i> en Isla Santa Cruz. Para cada subpoblación se calculó el número de individuos muestreados por localidad, el número de alelos encontrados, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), número de alelos privados, frecuencias alélicas y número de alelos privados corregidos con rarefacción. ....	80
<b>Tabla 4.</b> Índices globales de heterocigosidad obtenidos para los 87 individuos de <i>P.galapageium</i> muestreados en la Isla Santa Cruz.....	80
<b>Tabla 5.</b> Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para los individuos de <i>P.galapageium</i> de la Isla Santa Cruz.....	80
<b>Tabla 6.</b> Valores $F_{st}$ obtenidos para individuos de <i>P. galapageium</i> agrupados en 6 subpoblaciones Norte (Granillo Rojo, Los Gemelos), Noroeste (Salasaca), Noreste (Camote, Cerro Mesa), Este (Cascajo y Garrapatero), Surcentro (Bellavista, Tomás de Berlanga, Los Guayabillos, Occidente, Parque Artesanal y Elias Cando), Suroeste (Manzanillo, Chato, Caseta, Pájaro Brujo).....	81
<b>Tabla 7.</b> Valores $F_{ST}$ , $F_{IS}$ y $F_{IT}$ globales calculados para la población de <i>P.galapageium</i> de la Isla Santa Cruz .....	81
<b>Tabla 8.</b> Valores obtenidos con prueba de Mantel para la población de <i>P.galapageium</i> de la Isla Santa Cruz .....	81
<b>Tabla 9.</b> Coeficientes de coancestría obtenidos mediante el método de Wang para los individuos de <i>P.galapageium</i> de la Isla Santa Cruz mediante el software <i>Coancestry</i>	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** 93 muestras recolectadas en 17 localidades de la Isla Santa Cruz, Galápagos: GR:Granillo Rojo, GE:Los Gemelos, SA:Salasaca, CAM:Camote, CM:Cerro Mesa, CAS:Cascajo, GAP:Garrapatero, BE:Bellavista, TB:Tomás de Berlanga, PA:Parque Artesanal, GUA: Los Guayabillos, OCC:Occidente, MAN:Manzanillo, PB:Pájaro Brujo, EC:Elias Cando , CH:Chato, KZ:Caseta. Mapa realizado por Leo Zurita ..... 83
- Figura 2.** PCoA de los individuos de *P. galapageium* muestreados en la Isla Santa Cruz. Cada color representa a las 6 subpoblaciones. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos representados con los colores amarillo, rojo y verde. Individuos de las subpoblaciones del Suroeste y Noroeste se encuentran en el grupo de color rojo. Individuos de la subpoblación de Noreste se encuentran en el grupo de color amarillo. Los individuos de las subpoblaciones Sur, Centro, Norte y Este se encuentran distribuidos aleatoriamente en las tres agrupaciones (amarillo, rojo y verde). ..... 84
- Figura 3.** Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining (NJ) de los individuos de las 6 subpoblaciones de *P. galapageium* en la isla Santa Cruz. Las distancias genéticas entre los individuos de las subpoblaciones se reflejan en la longitud de las ramas. Las subpoblaciones del Noroeste y Noreste presentan ramas más alargadas a diferencia de las otras subpoblaciones. .... 85
- Figura 4.** Estructura poblacional obtenida mediante software STRUCTURE de los 87 individuos muestreados en la Isla Santa Cruz agrupados en 6 subpoblaciones con un valor óptimo de  $K=2$ . Los valores de  $K$  corresponden al número de acervos genéticos (representados con diferentes colores). ..... 85
- Figura 5.** Frecuencia de los coeficientes de endogamia  $F$  (promedio) observados en los 87 individuos de *P. galapageium* muestreados en Santa Cruz, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores  $F$  promedio cercanos a 0 (Valor  $F$  promedio=0.1-0.2), lo cual indica que no hay endogamia en la población. .... 86
- Figura 6.** Gráfica de los coeficientes de endogamia  $F$  de obtenido de los 87 individuos de *P. galapageium* muestreados en la Isla Santa Cruz. Cada punto representa un individuo y cada color su localidad. La mayoría de los individuos se distribuyen en un rango menor de 0.4, lo cual indica que no hay endogamia en la población. .... 86

## ANEXOS

- Anexo 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de muestras de *P.galapageium* de las localidades de Manzanillo (YMAN), Tomás de Berlanga (YTB), Elías Cando (YEC), Garrapatero (YGAP), Occidente (YOCC), Caseta (YKZ) y Bellavista (YBE). Ladder 100pb (Invitrogen). ..... 87
- Anexo 2.** 93 muestras recolectadas de 17 localidades en la Isla Santa Cruz, calidad de ADN, cuantificación (ng/UL), coordenadas de recolección y altura de las muestras sobre el nivel del mar. En amarillo se encuentran las muestras seleccionadas para la amplificación. .... 87
- Anexo 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar la amplificación de los loci microsatélites mediante el uso del sistema de tres primers a partir de las muestras de ADN de *P.galapageium* de distintas localidades de la Isla Santa Cruz. **a)** Amplificación con el primer GYB7 con muestras de Pájaro Brujo (YPB), Elías Cando (YEC), Chato (YCH), Caseta (YKZ), Bellavista (YBE), Cerro Mesa (YCM), Cascajo (YCAS), Garrapatero (YGAP) y Los Guayabillos (YGUA). **b)** Amplificación con el primer GYB29 con muestras de Manzanillo (YMAN), Granillo Rojo (YGR), Parque Artesanal (YPA), Los Gemelos (YGE), Cascajo (YCAS), Tomás de Berlanga (YTB), Cerro Mesa (YCM) y Bellavista (YBE). Ladder 100pb (Invitrogen) y Control Negativo..... 90
- Anexo 4.** Picos de fluorescencia generados después de la electroforesis capilar analizados en software GeneMarker. **a)** Individuo YGUA2 amplificado con el primer GYB27 y fluoróforo NED, se muestran dos alelos (heterocigoto) con tamaños de 325 y 331 pb. **b)** Individuo YGAP3 amplificado con el primer GYB23 y fluoróforo 6FAM, se muestra un alelo (homocigoto) con tamaño de 337 pb. .... 91
- Anexo 5.** 30 marcadores microsatélites diseñados con la cola A agregada (GCCTCCCTCGCGCCA) de los cuales se seleccionaron 15 primers para realizar el presente estudio marcados en amarillo. Se muestran las secuencias forward y reverse de cada uno, el número de motivos y la temperatura de *annealing* estandarizada. .... 91
- Anexo 6.** Mapa de recolección de muestras 93 de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz y las zonas de vegetación. Mapa realizado por Diego Urquía..... 93

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Especie en Estudio

*Psidium galapageium*, conocida también como guayabillo o “Galápagos Guava”, es una especie endémica de las Islas Galápagos. Pertenece a la clase Magnoliopsida de la familia *Myrtaceae* (Jaramillo & Guézou, 2013). Se caracteriza por ser un arbusto o árbol pequeño que puede alcanzar hasta los 8 metros de altura. Su tronco puede medir 1 metro de diámetro y se caracteriza por ser gris rosáceo y de corteza suave con ramas divaricadas. Las hojas son opuestas de forma elíptica a ovalada. Presenta flores solitarias blancas en ramas de crecimiento reciente, con estructuras tanto masculinas como femeninas. Su fruto es en forma de baya globosa que en su madurez presenta una coloración amarilla con numerosas semillas (McMullen, 1999; Porter, 1968). Su distribución específica aún se desconoce actualmente; sin embargo, se ha reportado su presencia en las islas Fernandina, Isabela, Pinta, Santa Cruz, Santiago y San Cristóbal. Los árboles de *Psidium galapageium* crecen principalmente en tierras bajas áridas y tierras altas húmedas (McMullen, 1999).

De acuerdo con Porter (1968), existen dos variedades de esta especie: *Psidium galapageium* var. *galapageium* y *Psidium galapageium* var. *howellii*. La primera variedad (*Psidium galapageium* var. *galapageium*) está conformada por árboles pequeños de 8 metros de altura, hojas opuestas y simples de 1.8 a 5.5 cm de largo, flores axilares y solitarias con corola blanca de 1.5 cm de ancho, pétalos que miden de 8 a 9 mm y yemas de flores no lobuladas. Por otro lado, la variedad *Psidium galapageium* var. *howellii* es considerada rara y se diferencia de la variedad *galapageium* por presentar pétalos más pequeños (4 a 5 mm), flores de 1 cm de ancho y yemas de flores lobuladas (Porter, 1968; McMullen, 1999).

### 1.1.1 Importancia de *Psidium galapageium*

Las especies endémicas son aquellas que crecen o se localizan en una región geográfica determinada y no pueden encontrarse en otro lugar del mundo. Son el resultado de una serie de procesos de especiación y evolución generados por la aparición de barreras naturales que no permiten que exista un intercambio genético. Debido a su alto nivel de especiación y falta de competencia, muchas veces se ven amenazadas por la introducción de otras especies que compiten por sus mismos recursos, generando así graves problemas para su conservación. Las especies endémicas son de gran importancia para la biodiversidad, ya que forman parte de un ambiente determinado y al verse afectadas o amenazadas, esto repercute tanto en el equilibrio del ecosistema, así como en las especies que interactúan con ellas (Heleno *et al.*, 2012).

*Psidium galapageium* es una especie endémica de las Islas Galápagos; sin embargo, existen muy pocos estudios sobre esta especie. La mayor parte de éstos se centran en estudios morfológicos, mas no de diversidad genética, ni propiedades medicinales o estado actual. Debido a la falta de conocimiento de esta planta, muchas veces se desconoce la importancia de la misma. De acuerdo a recientes investigaciones realizados por Cimadom *et al.*, (2016) en la Isla Santa Cruz, se han reportado que las hojas de *Psidium galapageium* presentan compuestos activos con propiedades repelentes que son utilizadas por aves, como los pinzones de las especies *Certhidea olivacea*, *Camarhynchus parvulus* y *Geospiza fuliginosa*. Los cuales utilizan las hojas de *P.galapageium* como esponja o loción para protegerse de mosquitos y hematófagos invasivos como la mosca introducida en las Islas Galápagos, *Philornis downsi*. Entre algunos de los compuestos volátiles secundarios que se han encontrado en *Psidium*

*galapageium*, a los cuales se los han relacionado por presentar un efecto repelente contra artrópodos, son: limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno (los cuales también se los han encontrado en la especie *Psidium guajava*). Por otro lado, también se han encontrado otros compuestos en *Psidium galapageium* como  $\beta$ -Cariopileno y linalool, de los cuales  $\beta$ -Cariopileno es el compuesto que se encontró mayoritariamente en los análisis realizados y se ha demostrado que presenta efectos repelentes contra mosquitos del género *Armigeres*, *Culex* y *Aedes*. Mientras que el compuesto Linalool también presenta un efecto repelente contra las especies de mosquito de los géneros *Aedes* y *Culex* (Cimadon *et al.*, 2016).

En ecosistemas sensibles como las Islas Galápagos el uso de insecticidas puede representar un problema debido a los efectos que pueden causar en el medio ambiente por su falta de especificidad a los organismos diana, afectando tanto a organismos perjudiciales, como a organismos inocuos o importantes para las islas. Por lo que el efecto repelente que puede presentar una planta endémica es potencialmente importante para la conservación de poblaciones de aves endémicas que se encuentran en peligro o amenazadas por patógenos o parásitos no nativos (Cimadon *et al.*, 2016). Por otro lado, los estudios realizados en plantas endémicas, como *Psidium galapageium*, son de gran importancia ya que permiten conocer la situación actual de la especie e implementar programas de conservación que beneficien tanto a esta especie, así como para la conservación de otras especies endémicas (Cimadon *et al.*, 2016).

## 1.2 Islas Galápagos

Las Islas Galápagos son un conjunto de islas volcánicas que se encuentran ubicadas a mil kilómetros de distancia de la costa continental del Ecuador (Gradstein *et al.*, 1982). Están formadas por 13 islas y varios islotes que se encuentran localizados sobre la placa de Nazca. Se estima que la edad promedio de las islas es de tres a cinco millones de años, generadas a partir de las erupciones volcánicas desde el fondo del océano (Brewington, 2011). La mayor parte de los islotes presentan una superficie extremadamente seca y con escasa vegetación. Las islas principales se encuentran, generalmente a 400 m de altura o más y se caracterizan por presentar diversa vegetación. Entre estas islas se encuentran: Fernandina, Isabela, Pinta, Pinzón, Santa Cruz y San Cristóbal (Gradstein *et al.*, 1982).

Las Islas Galápagos son consideradas como un gran laboratorio natural, debido a la gran cantidad de especies de flora y fauna endémica que se encuentran en ellas, así como por su importancia en estudios de evolución. La diversidad y ecosistemas únicos presentes en cada una de las islas son generados a partir del movimiento de la corriente fría de Humboldt y la corriente cálida de Panamá, que al chocar en la línea ecuatorial da lugar a una época cálida y lluviosa de enero a junio, y una época fría desde julio a diciembre (Brewington, 2011). Debido a este factor y a la distancia de las islas con el continente, han permitido que dentro del archipiélago se encuentren especies únicas que no se las puede encontrar en ningún otro ecosistema (Brewington, 2011).

Las Islas Galápagos fueron descubiertas por Fray Tomás de Berlanga en el año de 1535. De acuerdo con Brewington, (2011), aquellas plantas, animales e invertebrados que llegaron a las Islas después de 1535 son considerados introducidos. En el viaje de

Charles Darwin a las islas (300 años después) varias especies ya se habían introducido a las islas por vía marítima en embarcaciones piratas y corrientes marinas. Algunas de ellas se adaptaron al clima y se reprodujeron agresivamente, compitiendo con las especies endémicas, por lo que fueron consideradas como especies invasoras (Porter, 1822; Mauchamp, 1997). Actualmente en las Islas Galápagos se encuentran alrededor de 825 especies vegetales introducidas, muchas de las cuales fueron llevadas a las Islas por los primeros asentamientos humanos durante la época de 1800 y 1900. Este número de especies introducidas es superior a las 552 especies nativas y endémicas de las islas (Tye, 2001, 2002, 2006; Jaramillo *et al.*, 2012). De las especies introducidas, se considera que aproximadamente 30 especies son “agresivas” debido a su fácil colonización, ocupando extensas áreas de superficie, fácil dispersión y alta tasa de germinación, lo cual permite desplazar y afectar a las especies endémicas alterando su estabilidad e influyendo en su diversidad genética (Itow, 2003)

La Isla Santa Cruz es la segunda isla más grande de Galápagos después de la Isla Isabela. Se encuentra en el centro de las Islas Galápagos, y presenta un área de 986 km<sup>2</sup> y una altura de 864 msnm. De acuerdo con Humme (1993), la isla Santa Cruz se encuentra dividida en diferentes zonas de vegetación, las cuales son producto de la variación de la cantidad de lluvias con respecto a la altura. La cantidad de lluvia en las áridas tierras bajas se encuentra en un rango de 0-300 mm anualmente, mientras que en la zona montañosa el rango de lluvias es de 300 a 1700 mm. Así mismo, el clima se vuelve más frío y más nublado con la altura. Las zonas de vegetación se extienden en un rango desde el desierto, bosque nublado hasta el páramo y las especies que se encuentran en cualquiera de las áreas están adaptadas al rango de las condiciones ambientales encontradas para un área en particular. Las zonas de vegetación de la isla

Santa Cruz son: la zona costera, la zona árida, la zona de transición, la zona de Scalesia, la zona marrón, la zona de Miconia, y la zona de pampa (Humme, 1993; Kricher, 2006).

La zona costera se caracteriza por la salinidad que se encuentra en el área, lo cual limita el hábitat de plantas. El tipo de vegetación encontrada generalmente presenta habilidades de tolerancia a la salinidad y varían dependiendo del tipo de costa. Se pueden encontrar hierbas, arbustos suculentos y manglares (Humme, 1993). Por otro lado, la zona árida se caracteriza por ocupar las tierras bajas y la parte norte de la isla. Presenta un bosque semidesértico dominado por árboles y arbustos como *Bursera*, y especies tolerantes a la sequía como *Croton scouleri*, *Opuntia* y cactus *Jasminocereus*. Es una de las zonas de vegetación más extensas y con gran cantidad de especies endémicas. Entre la zona de Scalesia y la zona árida, se encuentra la zona de transición. Esta zona se encuentra dominada por especies como *Pisonia floribunda* y *Psidium galapageium* las cuales son especies endémicas. Es una zona más densa y diversa que la zona árida (Mueller-Dombois & Fosberg, 2013).

En la parte alta norte de la isla se encuentra la zona de Scalesia, la cual se encuentra dominada por el bosque de Scalesia, el cual es diverso y tiene tanto plantas de *Scalesia pedunculata* como otras especies endémicas como *P.galapageium*. En la parte más alta y lluviosa se sitúa la zona de la pampa donde se encuentran en su mayoría hierbas y helechos. La zona marrón se encuentra entre el bosque de Scalesia y la zona de Miconia; sin embargo, gran parte de esta zona se ha convertido en zona agrícola ocupada por plantas introducidas como *Psidium guajava*, *Cinchona pubescens* y *Rubus niveus*. Por otro lado, la zona de Miconia se encuentra en el sur de la isla, y al igual que

en la zona marrón, han sido ocupadas por la zona agrícola y la introducción de plantas (Humme, 1993; Kricher, 2006).

### **1.3 La Amenaza de las Especies Invasoras a Especies Endémicas**

Las especies invasoras son aquellas que son transportadas de su lugar nativo a una nueva región por asistencia humana, animal o natural (Cornel, 2016). Las especies invasoras se caracterizan por presentar una mayor tasa de adaptación debido a la plasticidad fenotípica que presentan en relación a las especies endémicas, lo cual les permite realizar ajustes morfológicos y fisiológicos para responder a cambios ambientales. Las plantas invasoras presentan también altas capacidades adaptativas lo cual les permite mantener un mayor fitness y habitar diversos ambientes y ecosistemas (Monaco & Sheley, 2012).

Por lo tanto, las especies invasoras son consideradas como uno de los problemas más serios para la biodiversidad nativa. Los efectos a las plantas introducidas son mucho más fuertes en ecosistemas de islas, puesto que ecológicamente las especies endémicas evolucionan bajo una presión selectiva reducida a diferencia de las especies que se encuentran en otras regiones (Heleno *et al.*, 2012). Debido al aislamiento que se generan en los ecosistemas insulares, los organismos que surgen del aislamiento presentan una alta tasa de especiación, lo cual puede causar que se vuelvan susceptibles a la extinción, puesto que no se encuentran preparados para competir con otras especies introducidas agresivas o enfrentar cambios extremos en el ambiente causados por efectos humanos (Randell *et al.*, 2004).

La competencia de las plantas endémicas con plantas introducidas agresivas, que se adaptan fácilmente a nuevos ambientes, puede afectar en gran medida a la degradación del hábitat natural. Los efectos de la introducción de especies agresivas en ambientes con plantas endémicas insulares se han podido observar en varios lugares del mundo como en Hawaii, Mauritius y Galápagos en donde el número de plantas introducidas llega a superar el número de plantas endémicas (Heleno *et al.*, 2012). Algunas de las islas que han resultado ser las más afectadas debido a la introducción de especies vegetales en las islas Galápagos son: Santa Cruz, San Cristóbal, Floreana e Isabela (Mauchamp, 1997).

A partir del siglo XX, gran cantidad del área de la isla Santa Cruz ha sido ocupada por la agricultura, y muchas de las prácticas agrícolas han sido las responsables de la introducción de plantas a la isla. Algunas de las plantas introducidas son la guayaba (*Psidium guajava*), la mora (*Rubus ulmifolius*), la pomarrosa (*Syzygium jambos*) y la supirrosa (*Lantana camara*) (Chiriboga *et al.*, 2006). En la actualidad, la guayaba se ha convertido en una planta altamente invasora, lo cual representa un problema, ya que altera la composición del suelo y compite con otras plantas endémicas (Brewington, 2011). De acuerdo con Veitch *et al.*, (2002) la introducción de esta planta se dio a finales del siglo XIX en la isla San Cristóbal por medio de los primeros habitantes de las islas con fines agrícolas y restringidas a pequeñas plantaciones. Pero fue a mediados de 1950 cuando las plantaciones se volvieron invasoras (Velasco, 2002). Por otro lado, se asume que la introducción de la guayaba en la isla Santa Cruz fue en 1930, volviéndose invasora después de 40 años de introducción, con una rapidez mayor que en la isla San Cristóbal (Eckhardt, 1972). La fácil dispersión de esta especie es llevada a cabo por aves, cerdos, burros y ganado, permitiendo su introducción tanto en

zonas agrícolas como dentro del Parque Nacional. Asimismo, uno de los dispersores de semillas de *Psidium guajava* en la isla Santa Cruz son las tortugas, las cuales transportan las semillas de *P. guajava* a través de sus excretas a lo largo de las tierras altas y húmedas de la zona agrícola (donde se encuentran plantas invasoras), hasta las tierras bajas en las zonas de Scalesia y de transición (donde se ubican especies endémicas) generando un peligro para la flora endémica como *P.galapageium* (Blake et al., 2012).

El género *Psidium* en Galápagos presenta una condición única, puesto que tiene tanto la especie endémica (*Psidium galapageium*) como la introducida (*Psidium guajava*) en un solo lugar. Esto genera un gran interés y preocupación debido a la posibilidad de hibridación que puede suceder entre ellas, y los posibles efectos negativos para la especie endémica (Valdebenito, comunicación personal, 2017). Un claro ejemplo acerca de los efectos negativos a especies endémicas debido a eventos de hibridación se ha reportado en la isla del Socorro en México. En donde se ha evidenciado la existencia de individuos híbridos entre la especie endémica *Psidium socorrense* y la especie introducida *Psidium santonium*, los cuales han generado una reducción de la población y la diversidad genética de la especie endémica (López-Caamal et al., 2014) Es por esto que la presencia de *Psidium galapageium* y *Psidium guajava* en la isla Santa Cruz ha generado retos y estudios para la erradicación y control de la especie invasora y la conservación de la especie endémica (Tye, 2007). Debido a la falta de estudios sobre la ecología, distribución y situación actual de estas dos especies, es importante realizar estudios de genética poblacional, mediante la determinación de la diversidad genética, que permitan conocer el estado actual de estas

dos especies en la isla, así como establecer programas de control y manejo de las especies mediante la información que se obtenga.

#### **1.4 Diversidad Genética y Biológica**

La diversidad biológica o biodiversidad es la variabilidad de formas de vida que habitan en un ecosistema determinado (IUCN, 1996). Dentro de esta diversidad se encuentra la diversidad genética, la cual está definida como la variación de genes dentro y entre especies. Esta diversidad genética puede ser comparada entre los individuos de una población, entre poblaciones dentro de la misma especie y entre especies (Glowka *et al.*, 1996). Toda la variación de genes presentes en las especies son la materia prima de la evolución. La variación genética moldea y define a los individuos, poblaciones, subespecies y especies en el planeta. La diversidad genética entre los individuos permite analizar la presencia de distintos alelos en un pool genético y permite determinar diferentes genotipos entre las poblaciones. La diversidad genética existente entre individuos pueden ser el resultado de mutaciones o recombinaciones; sin embargo, eventos como la selección natural, el flujo génico y la deriva génica pueden provocar cambios en la diversidad entre las especies (Eguiarte *et al.*, 2010)

La variación genética juega un rol importante en la plasticidad fenotípica de las especies, puesto que determina el potencial de respuesta para la supervivencia y adaptación a condiciones cambiantes (Mukhopadhyay & Bhattacharjee, 2016). Asimismo, el nivel de diversidad genética es importante para conocer la situación actual en la que se encuentra una especie, puesto que al presentar un alto grado de diversidad genética está relacionada con una mayor capacidad de adaptabilidad a alteraciones o presiones medioambientales, así como la posibilidad de presentar características útiles como la resistencia a enfermedades o patógenos. Sin embargo, al disminuir el grado de

variabilidad genética disminuye la capacidad de adaptarse y evolucionar frente a las variables medioambientales, aumentando así el riesgo de extinción (Caruso *et al.*, 2015). Por otro lado, la información sobre la diversidad genética de una especie es muy importante para el desarrollo de estrategias y programas de conservación de las especies, es por esto que se encuentra siendo estudiada en varios campos de la Biología, como la Biología de la Conservación, así como en Genética de Poblaciones mediante el uso de técnicas moleculares y herramientas de análisis estadísticos (Mukhopadhyay & Bhattacharjee, 2016).

### **1.5 Marcadores Moleculares**

Los marcadores genéticos son muy utilizados hoy en día y presentan un rol importante para los estudios de variabilidad y diversidad de especies. Un marcador genético es cualquier rasgo que permita representar las diferencias genéticas entre organismos individuales o especies. Un tipo de marcador genético muy utilizado actualmente son los marcadores de ADN o marcadores moleculares los cuales permiten identificar los sitios de variación en el ADN (Kordrostami & Rahimi, 2015). Los marcadores moleculares son secuencias de nucleótidos polimórficas que se encuentran dispersas en el genoma y las mutaciones son detectadas mediante técnicas basadas en PCR (Gostimsky *et al.*, 2005). Estos marcadores permiten identificar diferencias en el genoma partiendo de mutaciones en el ADN como mutaciones puntuales (sustituciones), inserciones o deleciones, así como de errores en la replicación en tándem de ADN (Paterson, 1996; Falque & Santoni, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Los marcadores moleculares se diferencian de otros tipos de marcadores genéticos (morfológicos y bioquímicos) debido que estos son selectivamente neutrales, puesto que se encuentran en regiones no codificantes de ADN; asimismo, no son afectados por

factores ambientales, presentan una mayor estabilidad y confiabilidad y no consumen demasiado tiempo (Winter, 1995).

Los marcadores moleculares se encuentran divididos en dos categorías principales: los marcadores moleculares basados en PCR y marcadores moleculares basados en técnicas de hibridación (Schulman, 2007). Entre algunos de los marcadores moleculares que están basados en PCR se encuentran los RAPDs (Random amplified polymorphic DNA), ISSRs (Inter-Short Sequence Repeats) y AFLPs (Amplified fragment length polymorphism) los cuales se caracterizan por ser marcadores dominantes, por lo que no permiten identificar individuos homocigotos o heterocigotos, así como por presentar una baja replicabilidad (DeVienne, 2003). Otros marcadores dependientes de PCR son los SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) y los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeat), los cuales son marcadores codominantes que sí permiten diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos, brindando una gran ventaja al momento de obtener información (Paterson, 1996).

### **1.6 Marcadores Microsatélites**

Los marcadores microsatélites son secuencias cortas que se repiten en tándem de 1-6 pb, las cuales no se repiten solo en un locus particular, sino que se encuentran distribuidas en loci genómicos diferentes (Tautz & Renz, 1984). Los patrones más comunes de repeticiones en los genomas de plantas son  $(AT)_n$ ,  $(GA)_n$  y  $(GAA)_n$ , donde  $n$  se refiere al número de repeticiones los cuales pueden ir de 10 a 100 repeticiones (Queller *et al.*, 1993). Los marcadores microsatélites presentan varias ventajas que los convierten en marcadores moleculares de elección, pues se caracterizan por tener un alto nivel de polimorfismo genético, son codominantes (permitiendo diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos), permiten diferenciar alelos fácilmente, se

encuentran ampliamente distribuidos en el genoma, son de bajo costo en relación a otros marcadores, presentan selección neutral y son altamente reproducibles (Dudley, 1993).

La técnica para la utilización de marcadores microsatélites se basa en la amplificación mediante PCR, en la cual se utilizan primers específicos que se van a hibridar en regiones conservadas que flanqueen la región de la secuencia de ADN (que tiene las secuencias repetitivas) (Masuelli, 1999). A pesar de que esta técnica es relativamente sencilla, la desventaja radica en que para el diseño de primers específicos es necesario el conocimiento del genoma completo de la especie que se pretende estudiar (Masuelli, 1999). Sin embargo, en la actualidad, se han desarrollado cientos de primers microsatélites específicos para varias especies tanto de plantas como de animales, así como se utilizan primers heterólogos entre especies cercanamente emparentadas (Nogueira *et al.*, 2016; Kanupriya *et al.*, 2011). Los marcadores microsatélites son muy utilizados para determinar las variaciones genéticas existentes en el genoma de una especie determinada, por lo cual presentan una serie de aplicaciones en genética vegetal, mejoramiento genético, así como en estudios de estructura poblacional y relaciones filogenéticas (Joshi *et al.*, 1999).

Anteriormente, para la identificación y posterior análisis de los microsatélites se separaban los productos de la amplificación en geles de poliacrilamida con tinción de plata. Sin embargo, esta técnica resultaba demorosa y laboriosa, por lo que en la actualidad se ha desarrollado el genotipado con fluorescencia que permite marcar cada primer con un fluoróforo específico (VIC, 6FAM, PET, NED) y analizar los microsatélites mediante los resultados obtenidos por electroforesis capilar. No obstante, el uso de primers marcados directamente con fluoróforos puede resultar costoso, por lo

cual se ha desarrollado el protocolo de tres primers. Este protocolo consiste en el uso de un oligonucleótido o cola universal el cual está marcado con un fluoróforo específico, un primer forward específico modificado con la secuencia de la cola universal en el extremo 5' complementaria a la secuencia del primer universal y un primer reverse específico. Durante la reacción de PCR, el primer forward modificado con la secuencia se va a encontrar en menor concentración en relación a los otros dos primers, por lo que se va a agotar y en los ciclos posteriores se va a incorporar el primer universal marcado con fluoróforo generando fragmentos marcados con el fluoróforo. Al finalizar, los productos de PCR marcados con fluoróforos pueden ser diferenciados mediante electroforesis capilar que va a permitir separarlos por tamaños mediante la detección de fluorescencia (Blackett *et al.*, 2012).

En el presente estudio se diseñó y estandarizó un protocolo de amplificación para 15 primers microsatélites específicos de *Psidium galapageium* con el objetivo de evaluar la diversidad genética de la población de esta especie endémica en la isla Santa Cruz, Galápagos. Se analizaron 87 individuos de *P. galapageium* de 17 localidades de la isla para conocer el estado actual de esta especie.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

Determinar la diversidad genética de la población de *Psidium galapageium* de la isla Santa Cruz, Galápagos, empleando primers microsatélites específicos como marcadores moleculares.

## 2.2. Objetivos Específicos

- a) Diseñar marcadores microsatélites específicos para *P.galapageium* a partir de su genoma secuenciado.
- b) Seleccionar y sintetizar 30 marcadores microsatélites específicos para *P.galapageium*.
- c) Estandarizar el protocolo de amplificación para los marcadores SSRs seleccionados de *P. galapageium* mediante el método de los tres primers (Blackett *et al.*, 2012).
- d) Analizar la estructura poblacional y la diversidad genética en la población de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz, Galápagos.
- e) Comparar la diversidad genética de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz con la diversidad genética de *P.galapageium* de la isla San Cristóbal.

## 3. ÁREA DE ESTUDIO

Para la realización del presente estudio se recolectaron muestras de *Psidium galapageium* en 17 localidades de la isla Santa Cruz, Galápagos, Ecuador (Los Gemelos, Granillo Rojo, Tomás de Berlanga, Salasaca, Camote, Manzanillo, Cascajo, Los Guayabillos, Chato, Parque Artesanal, Occidente, Garrapatero, Bellavista, Cerro Mesa, Elias Cando, Pájaro Brujo y Caseta). En cada localidad se recolectó de 2 a 5 hojas de *P. galapageium* obteniendo un total de 93 individuos que cubrían todas las localidades antes mencionadas.

La extracción, cuantificación y diluciones de ADN se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Galápagos Science Center (GSC), ubicado en la isla San Cristóbal. La amplificación de microsatélites, genotipificación y análisis estadísticos de los datos obtenidos de las muestras de *P.galapageium* se realizó en el Laboratorio de

Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. La electroforesis capilar para la identificación de alelos mediante detección de fluorescencia se realizó mediante envíos de placas a MacroGen, Corea.

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

Las islas Galápagos son consideradas laboratorios naturales debido a la amplia variedad de especies endémicas que poseen. Este alto nivel de endemismo encontrado en las islas se debe al aislamiento del archipiélago, el cual ha permitido la evolución y adaptación de especies en condiciones ambientales particulares y con una baja tasa de depredadores. Sin embargo, estas mismas características han generado que los ecosistemas de las islas se vuelvan frágiles frente a las perturbaciones provocadas por el ser humano, como la sobre explotación de recursos forestales propios de las islas, fragmentación de bosques nativos, así como la introducción de plantas o animales desde el continente con fines agrícolas o ganaderos, que ponen en riesgo a especies endémicas y nativas de las islas (Hamman, 1984; Lawesson, 1990; Itow, 2003).

De acuerdo con anteriores investigaciones se calcula que en las Islas Galápagos se encuentran alrededor de 825 especies vegetales introducidas (Jaramillo *et al.*, 2012), de las cuales 30 son consideradas agresivas debido a su alto índice de dispersión, germinación y su capacidad de ocupar amplias superficies llegando a desplazar a especies endémicas tanto animales como vegetales (Itow, 2003). Una de las islas donde se ha reportado gran cantidad de introducción de especies es en la isla Santa Cruz, la cual también es considerada como una de las islas más pobladas del archipiélago (Brewington, 2011).

Esta creciente introducción de especies en la isla Santa Cruz, ha generado gran preocupación puesto que actualmente tanto la especie endémica *Psidium galapageium* como la especie introducida *Psidium guajava* coexisten en la misma isla. *Psidium galapageium* es una especie endémica de las islas Galápagos, que se encuentra catalogada como amenazada (Walter & Gillet, 1998; Tye, 2007). A pesar de la falta de información y estudios sobre esta especie, se ha reportado que es de gran importancia para otras comunidades de las islas, como los pinzones que utilizan los extractos de sus hojas como repelente contra moscas invasoras (Cimadom *et al.*, 2016). Por otro lado, la especie *Psidium guajava* es una especie que fue introducida en la isla Santa Cruz en 1930 con fines agrícolas; sin embargo, actualmente está considerada como altamente invasora debido a su gran capacidad de expansión y adaptación (Walsh *et al.*, 2007).

La presencia de estas dos especies en la isla, ha causado gran interés debido a los efectos negativos que puede generar la especie invasora a la especie endémica (Valdebenito, comunicación personal, 2017). Dado que estas dos especies pertenecen al género *Psidium*, la naturalización y simpatría entre estas especies puede ocasionar una hibridación natural entre ellas. Lo cual puede afectar a que la especie endémica deje de producir descendencia de su propia especie y genere híbridos con la especie introducida, afectando su diversidad genética y su fitness (Huxel, 1999). Este hecho se ha evidenciado en otras especies endémicas e invasoras del género *Rubus* (*Rubus hawaiensis* y *Rubus niveus*) en la isla de Hawai, así como en especies del género *Psidium* (*Psidium socorrense* y *Psidium sartonium*) de la isla del Socorro, donde las especies endémicas han perdido idoneidad debido a una mejor adaptación de los híbridos generados con las especies invasoras (Randell *et al.*, 2004; López-Caamal *et al.*, 2014). Por lo que ejemplos como estos, permiten comprender la importancia de

documentar la situación actual y las relaciones moleculares/genéticas entre las especies endémicas e invasoras de un mismo género.

Es por esto que el realizar estudios de diversidad genética permite obtener información útil para conocer el estado actual de la especie *Psidium galapageium* y de esta forma generar programas para su conservación, así como programas de control y manejo de especies invasoras que son consideradas agresivas, como *Psidium guajava*. De igual forma, este tipo de estudios permiten complementar y contribuir a la información obtenida por otros análisis referentes a las especies *Psidium galapageium* y *Psidium guajava* llevadas a cabo en otras islas del archipiélago (Ponce, 2014; Ponce, 2016; Urquía 2017; Torres & Mena, 2018).

## 5. MATERIALES

### 5.1. Material Vegetal

- Hojas de 93 individuos de *P. galapageium* recolectados en 17 localidades de la isla Santa Cruz (Anexo 1)
  1. Granillo Rojo: 10 muestras
  2. Los Gemelos: 7 muestras
  3. Salasaca: 6 muestras
  4. Camote: 6 muestras
  5. Cerro Mesa: 3 muestras
  6. Cascajo: 7 muestras
  7. Garrapatero: 6 muestra
  8. Bellavista: 6 muestras
  9. Tomás de Berlanga: 7 muestras
  10. Parque Artesanal: 7 muestras
  11. Los Guayabillos: 6 muestras
  12. Occidente: 6 muestras
  13. Manzanillo: 6 muestras
  14. Pájaro Brujo 1 muestra
  15. Elías Cando: 2 muestras
  16. Chato: 6 muestras
  17. Caseta: 1 muestra

## 5.2 Extracción de ADN

- Hojas de los individuos de *P. galapageium* muestreados
- Mortero y pistilo
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol 91% (Merck)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- 2, B-mercaptoetanol
- Etanol 70%

## 5.3 Cuantificación y dilución de ADN

- ADN extraído de *P. galapageium*
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)

## 5.4 Electroforesis en geles de agarosa

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

## 5.5 Amplificación de regiones microsatélites mediante PCR

- ADN diluido de *P. galapageium* (concentración de 20ng/μl)
- 15 pares de primers SSR específicos para *Psidium galapageium* (Tabla 2)
- Taq DNA polimerasa Platinum 5U/μl (Invitrogen).
- Buffer PCR 10X (Invitrogen).
- MgCl<sub>2</sub> 50mM (Invitrogen).
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO).
- dNTP's 10 mM (Invitrogen).
- Cola universal A (5'GCTCCCTCGCCCA) marcada con distintos fluoróforos. (6FAM, NED, PET, VIC) (Invitrogen).
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).
- T100 Thermocycler (BioRad).
- BSA (Thermo Fisher Scientific)

## 5.6. Genotipado en Placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems ®)

- 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems ®)
- Software GeneMarker ® (SoftGenetics LLC, 2012)

## 5.7. Análisis de datos

- Software R-studio (RStudio Team, 2015)
- Software STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard *et al.*, 2004)
- Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2012)
- Software CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg, 2007)
- Software distruct (Rosenberg, 2004)
- Software Coancestry (Wang, 2011)
- Microsoft Excel ®
- Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010)
- GenAlex (Peakall & Smouse, 2012)

# 6. MÉTODOS

## 6.1 Recolección de muestras de *P. galapageium* en la isla Santa Cruz

Se recolectaron muestras de *P. galapageium* en la salida de campo que se realizó en mayo del 2015. Se recolectaron de 2 a 5 hojas de un total de 93 individuos de guayabillo distribuidos en distintas localidades de la isla Santa Cruz. Las hojas fueron obtenidas de las siguientes localidades: Granillo Rojo, Los Gemelos, Salasaca, Camote, Cerro Mesa, Cascajo, Garrapatero, Bellavista, Tomás de Berlanga, Parque Artesanal, Los Guayabillos, Occidente, Manzanillo, Pájaro Brujo, Elias Cando, Chato, Caseta (Figura 1). Se tomaron las coordenadas mediante un GPS de cada uno de los individuos muestreados, se almacenó el material vegetal en fundas plásticas y posteriormente fueron mantenidos en congelación a -20°C.

## 6.2 Extracción de ADN

El ADN de las hojas de *P. galapageium* se extrajo mediante la utilización del buffer CTAB de acuerdo al protocolo descrito por Saghai y Maroof (Saghai-Maroof, 1984). Primeramente, se tomaron 25 mg de hoja, y se trituró con ayuda del pistilo en el mortero previamente desinfectado con etanol al 70%. El material vegetal triturado de cada individuo se lo colocó en diferentes tubos Eppendorf de 1.5 ml. En éstos se añadió 800 ul de buffer CTAB, el cual es un detergente catiónico utilizado para la extracción de ácidos nucleicos que se encarga de formar complejos con proteínas. Posteriormente se agregó  $\beta$ -mercaptoetanol, el cual se encarga de romper los puentes disulfuro que se encuentran en las proteínas. Luego se incubó en la cámara de arena a 62°C por una hora y se agitaron los tubos cada 10 minutos. Al finalizar la incubación se colocó 500 ul de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y se pudo observar la formación de dos fases, una fase acuosa donde se encontraban los ácidos nucleicos y una fase donde se encontraban las proteínas. Se dejó reposar por veinte minutos y luego se centrifugó por veinte minutos a 13 800 rpm. Con la ayuda de una micropipeta se separó la fase acuosa y se la trasladó a otros tubos Eppendorf de 1.5 ml. Para la precipitación del ADN se añadió alcohol isopropílico y se agitó delicadamente los tubos. Posteriormente se centrifugaron los tubos de 2 a 5 minutos a 5000 rpm hasta obtener la formación del pellet, en el cual se encontraba el ADN. Luego se descartó el sobrenadante y se procedió al lavado del ADN con etanol al 70% con la finalidad de que el pellet pueda despegarse de la pared del tubo. Posteriormente se descartó el sobrenadante y se puso a secar el tubo en la cámara de flujo laminar con el fin de que el pellet quede sin residuos de etanol. Al finalizar el secado se resuspendió el ADN del pellet en 50 ul de TE y se lo almacenó a una temperatura de -20°C.

### 6.3 Preparación de Muestras

Luego de extraer el ADN de cada muestra se procedió a cuantificar la concentración de ADN, así como su calidad en relación a la concentración de contaminantes proteicos y fenólicos mediante espectrofotometría utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Al finalizar se comprobó la integridad del ADN extraído de cada muestra mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (Anexo 1). Posteriormente se diluyeron las muestras a una concentración de 20 ng/ul.

### 6.4. Diseño de primers específicos para *P.galapageium*

Para el diseño de primers específicos para *Psidium galapageium* se contó con la colaboración de la Dra. Jennifer Rowntree, Manchester Metropolitan University, quien se encargó del secuenciamiento del genoma de la especie *P.galapageium*. Para el secuenciamiento de *P. galapageium* se utilizó una muestra de ADN de esta planta y se secuenció (Paired-end sequencing) mediante la ayuda de la plataforma Illumina MiSeq (Genetics Core Facility, University of Manchester). Posteriormente, las lecturas resultantes de esta plataforma pasaron a un proceso de filtrado con la herramienta para Illumina, Trimmomatic v0.30 (Lohse *et al.*, 2012) y se recortaron con la función 'sliding window' con la finalidad de disminuir el número de lecturas y mejorar su calidad obteniendo aproximadamente 2 x 1 783 686 lecturas. Luego se procedió a la identificación de los microsatélites y sus regiones flanqueantes (PALs), mediante el programa PAL\_finder v.0.02 (Castoe *et al.*, 2012; Griffiths, 2013), al cual se lo configuró para que busque un mínimo de ocho unidades repetidas con motivos de 2-6 nucleótidos. El diseño de primers se realizó mediante el programa Primer 3 (Koressaar & Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012). Los parámetros para el diseño de los primers

utilizados en el programa fueron en base a las recomendaciones del protocolo *Type-it Microsatellite PCR kit* (Qiagen, Germany) el cual incluía el contenido de CG de 40-60%, número óptimo de pares de bases entre 21-30 pb, temperatura óptima de melting (T<sub>m</sub>) de 62°C, temperatura mínima de melting (T<sub>m</sub>) 59°C, temperatura máxima de melting (T<sub>m</sub>) 65°C, diferencia máxima de T<sub>m</sub> entre pares de primers de 3°C.

Después de los parámetros establecidos se generó una lista de loci microsatélites, de los cuales se seleccionaron 30 loci que tengan motivos de 3-4 nucleótidos. Posteriormente se sintetizaron los primers para cada uno de los 30 loci, agregando en los primers forward la secuencia correspondiente a la Cola A (Tail A) (Blackett *et al*, 2012) para poder realizar la técnica de los tres primers durante la amplificación.

### **6.5 Estandarización de primers específicos para *P. galapageium***

Se realizó la estandarización de la temperatura de *annealing* de los 30 pares de primers mediante PCR con 10 muestras de ADN del Anexo 2. El programa de amplificación para la estandarización se basó en las condiciones descritas en Schuelke (2000) con modificaciones, para lo cual se utilizó el siguiente protocolo en cada reacción: se utilizó un volumen total de 10 ul con 20 ng de ADN, Buffer de PCR 1x, 0,2 µM de dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, California, USA), 1mg/L BSA, 0,5 mM de Primer Reverse y Primer marcado con uno de los fluoróforos (VIC, 6FAM, PET O NED) y 0,15 Mm Primer Forward modificado con la Cola A, 1 U de Taq Polimerasa Platinum. El programa de termociclado utilizando el termociclador T100 BioRad fue de 35 ciclos, con los siguientes pasos: Denaturación inicial a 95°C durante 15 minutos, denaturación a 94°C durante 30 segundos, 1 minuto y 30 segundos de *Annealing*

(gradiente de temperaturas de 59°C-67°C), Elongación a 72°C durante 1 minuto, y Elongación final a 72°C. durante 5 minutos.

Posterior a la estandarización de temperaturas se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1.5% para observar el producto amplificado. Las muestras resultantes fueron enviadas a Macrogen Corea para su genotipado. Con los resultados obtenidos del genotipado se seleccionaron los primers más polimórficos en base al número de alelos encontrados y con mayor éxito de amplificación.

### **6.6 Amplificación con 15 primers específicos para *P.galapageium***

De los 30 primers iniciales se seleccionaron 15 primers SSR que resultaron ser más polimórficos y con mayor éxito de amplificación, y se procedió a la amplificación por PCR seleccionando 87 de las 93 muestras de ADN de *P.galapageium*. Las muestras seleccionadas presentaron mayores concentraciones y mejor calidad de ADN. Para la amplificación con todas las muestras se utilizó el protocolo mencionado en la estandarización de primers: se utilizó un volumen total de 30 ul con 60 ng de ADN, Buffer de PCR 1x, 0,2 µM de dNTPs, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen, California, USA), 1mg/L BSA (el cual resultó ser un buen compuesto aditivo aumentando la actividad de la polimerasa y actuando en contra de inhibidores que podían afectar la PCR), 1 U de Taq Polimerasa Platinum, 0,5 mM de Primer Reverse y Primer marcado con uno de los fluoróforos (VIC, 6FAM,PET O NED) y 0,15 Mm Primer Forward modificado con la Cola A. El programa de termociclado utilizando el termociclador T100 BioRad fue de 35 ciclos, con los siguientes pasos: Denaturación inicial a 95°C durante 15 minutos, denaturación a 94°C durante 30 segundos, 1 minuto y 30 segundos de *Annealing* (temperatura estandarizada dependiente del primer utilizado) (Tabla 2), Elongación a 72°C durante 1 minuto, y Elongación final a 72°C durante 5 minutos.

La amplificación de cada una de las muestras con los distintos primers se verificó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, colocando 4 ul de producto de PCR con 3 ul de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 1 ul de Ladder 100 pb, y se corrió el gel a 100 voltios por 30 minutos (Anexo 3).

### **6.7 Genotipado de los individuos de *P.galapageium* amplificados**

Tras verificar la amplificación de cada uno de los individuos de *P.galapageium* se procedió al envío de las placas a Macrogen, Corea. La preparación de las placas consistió en colocar 40 ul de producto de PCR en total (10 ul de cuatro distintas reacciones marcadas con cuatro fluoróforos diferentes) en cada pocillo. Al completar la preparación de las placas, estas fueron enviadas a Macrogen, Corea para su genotipado. El genotipado se realizó mediante el secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Este secuenciador permite identificar los genotipos de cada individuo para cada uno de los loci microsatélites mediante electroforesis capilar. Este método consiste en separar los fragmentos por tamaño y desplazarlos hacia un rayo de láser el cual va a emitir una señal de fluorescencia. Esta señal es separada mediante un sistema de difracción y con la ayuda de una cámara CCD se va a detectar la fluorescencia. La emisión de señal de fluorescencia es convertida en datos digitales los cuales van a estar almacenados en archivos con formato .fsa compatibles con el software GeneMarker® (SoftGenetics LLC, 2012), con el cual se analizaron los datos. Este programa permitió determinar el tamaño de los pares de bases de los alelos de cada individuo, mediante la visualización de picos de fluorescencia, generados con el secuenciador con relación al ladder 500 LIZ utilizado (Anexo 4).

## 6.8 Análisis de datos

Con cada uno de los tamaños obtenidos en la identificación de genotipos se realizó una matriz codominante en la cual se agruparon a los 87 individuos (de las 17 localidades) en 6 subpoblaciones (similares a las realizadas por Urquía (2017)) para facilitar los análisis a realizarse. El criterio para formar las subpoblaciones fue la cercanía geográfica en las que se encontraban, puesto que varias localidades se encontraban muy cercanas entre sí, por lo que fácilmente pudieron ser consideradas como un solo grupo. La matriz resultante fue utilizada para cada uno de los análisis realizados. Las 6 subpoblaciones se realizaron agrupando a las localidades más cercanas, es decir a aquellas que se encontraban aproximadamente a 2 km de distancia entre sí. Las 6 subpoblaciones son: Norte (agrupando a las localidades Granillo Rojo y Los Gemelos ubicadas al Norte de la isla), Noroeste (agrupando a la localidad de Salasaca ubicada al Noroeste de la isla) Noreste (localidades Camote y Cerro Mesa ubicadas al Noreste de la isla), Este (localidades de Cascajo y Garrapatero ubicadas al Este de la isla), Sur Centro (localidades de Bellavista, Tomás de Berlanga, Los Guayabillos, Occidente, Parque Artesanal y Elias Cando) y Suroeste (agrupando a las localidades Manzanillo, Chato, Caseta y Pájaro Brujo ubicadas al suroeste de la isla) (Tabla 1).

Se debe tomar en consideración que para la construcción de la matriz y para los análisis de datos realizados se consideró el mismo criterio de diploidía, utilizado en el estudio de *P.galapageium* de la Isla San Cristóbal (Ponce, 2016).

Mediante el programa R Studio (RStudio Team, 2015) se realizaron los análisis de diversidad genética de *P.galapageium*, calculando el número de alelos, heterocigosidades esperadas ( $H_e$ ) y observadas ( $H_o$ ). Además, para conocer qué tan informativos son los loci utilizados se calculó el índice de PIC (Polymorphic Information Content). Asimismo, se analizó la distribución de la diversidad genética y estructura poblacional para lo cual se calcularon los valores de  $F_{st}$  y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con los individuos analizados en la isla Santa Cruz, así como un árbol Neighbour Joining (NJ) sin raíz. Por otro lado, mediante la ayuda del software *GenAlex* 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) se calculó los alelos privados de cada una de las subpoblaciones.

Con el objetivo de tener valores reales de riqueza alélica y de alelos privados se utilizó el software HP-RARE 1.0 (Kalinowski, 2005; Urquía, 2017). Este software permitió compensar la disparidad de los tamaños de muestras de las diferentes subpoblaciones y obtener tamaños más homogéneos, estableciendo un número de individuos de  $N=13$  (valor obtenido calculando la mediana del número total de individuos muestreados en todas las subpoblaciones). De esta manera se corrigió mediante la técnica estadística de rarefacción tanto el número de alelos, como los alelos privados en cada subpoblación (Kalinowski, 2005; Urquía, 2017).

Por otro lado, se realizó un Análisis de inferencia bayesiana mediante el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2004) con el objetivo de evaluar el número de linajes posibles ( $K$ ) y la estructura poblacional de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz. Para este análisis fue necesario modificar la matriz agrupada en subpoblaciones, con la finalidad de hacerla compatible con el formato STRUCTURE

(.txt). En este análisis se realizaron dos corridas. La primera corrida se realizó con  $K=1$  hasta  $K=17$ , por 10 iteraciones con un burnin de 10000 y MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 100000. Posteriormente, los resultados fueron analizados en Structure Harvester (Earl & vonHold, 2012) para establecer el valor óptimo de  $K$ . Después de establecer el  $K$  óptimo se realizó una segunda corrida en el software STRUCTURE con los siguientes parámetros:  $K=1$  hasta  $K=7$  (el cual contenía los dos mejores  $K$ ) por 20 iteraciones con un burnin de 100000 y MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 1000000, los resultados obtenidos en esta segunda corrida fueron analizados nuevamente en Structure Harvester para obtener la  $K$  óptima. Posteriormente, con la ayuda del software CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg, 2007), se recopilaron y alinearon todas las iteraciones de los dos mejores  $K$ , y mediante el software Distruct (Rosenberg, 2004), se generó el gráfico final.

Adicionalmente, se utilizó el programa Coancestry (Wang, 2011) para evaluar el nivel de parentesco entre los individuos de las poblaciones analizadas. Se utilizó el índice de Wang para estimar los coeficientes de coancestro ( $\theta_{xy}$ ) para cada subpoblación. Por otro lado, se estimó el nivel de endogamia (inbreeding) entre los individuos de las subpoblaciones de *P.galapageium* mediante el programa R Studio (RStudio Team, 2015).

Mediante el software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) se realizó una prueba de Mantel para observar si existe una correlación entre las distancias geográficas y genéticas, así como un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las subpoblaciones establecidas.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Extracción de muestras y cuantificación**

Se logró extraer ADN de 93 muestras de *P.galapageium* colectadas en la Isla Santa Cruz en 17 localidades. En la cuantificación realizada, el ADN obtenido en cada una de las muestras fue de buena calidad y las concentraciones obtenidas variaban entre 144 ng/UL- 1007 ng/UL (Anexo 2), la integridad y calidad del ADN genómico se confirmó mediante la electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, en los cuales se evidenció la presencia de bandas claras para todas las muestras (Anexo 1).

### **7.2 Diseño de primers específicos para *P.galapageium***

Se obtuvo 366 loci microsatélites con motivos de 2, 3 y 4 pares de bases. De estos loci resultantes, se seleccionaron 30 loci que presentaron una longitud de secuencias forward y reverse de 20 a 25 pares de bases y motivos de 3 a 4 nucleótidos (Anexo 5). Esta selección se realizó, puesto que los motivos de 1 a 2 nucleótidos pueden generar picos falsos al momento del genotipado, debido a la generación de stutter bands (o bandas de tartamudeo) por el deslizamiento de la Taq polimerasa durante la amplificación (Guichoux *et al.*, 2011; Schwengel *et al.*, 1994). Adicionalmente, para la síntesis de estos 30 primers se agregó la cola A en el extremo 5' de las secuencias Forward (Blackett *et al.*, 2012).

### **7.3 Estandarización y amplificación con primers específicos para *P. galapageium***

De los 30 primers sintetizados se logró obtener una estandarización exitosa de 21 primers microsatélites. De los 9 pares restantes sin estandarización exitosa, los primers GYB1, GYB10, GYB16 y GYB17 presentaron inespecificidades, mientras que

con los primers GYB2, GYB13, GYB19, GYB24 y GYB28 no se obtuvo amplificación, a pesar de cambiar las condiciones de PCR y temperaturas de *annealing*.

De los 21 primers con estandarización exitosa se seleccionaron 15 primers para la amplificación con 87 muestras de *P.galapageium* seleccionadas (Anexo 5). La selección de estos 15 primers se realizó en base a los resultados obtenidos en el genotipado de las 10 muestras utilizadas para la estandarización de los 30 primers (Sección 6.5). En los cuales, los 15 primers seleccionados presentaron una amplificación exitosa y generaron picos con fluorescencia detectable que permitieron identificar un alto número de alelos.

Al realizar la amplificación de los 15 primers seleccionados con las 87 muestras de *P.galapageium* de la Isla Santa Cruz se encontró un total de 99 alelos. Todos los 15 loci resultaron ser polimórficos, de los cuales, GYB14 y GYB18 presentaron el mayor número de alelos (11), mientras que GYB4 presentó el menor número de alelos (3). En los loci restantes se encontró un rango de 5 a 8 alelos. En promedio se encontró un total de 6.6 alelos para los 15 loci analizados (Tabla 2).

Por otro lado, se calculó el valor PIC, el cual se encarga de medir el índice de contenido polimórfico en un locus determinado. Este índice se mide en un rango de 0 a 1, donde: valores de PIC mayores a 0.5 indican un alto nivel de polimorfismo, valores de PIC entre 0.25 y 0.5 son considerados moderadamente informativos; mientras que valores menores a 0.25 son considerados poco informativos (Botstein *et al.*, 1980; Ceballos-Aguirre *et al.*, 2017). De acuerdo a los resultados obtenidos, se pudo observar que 11 de los 15 primers utilizados (GYB3, GYB4, GYB5, GYB8, GYB9, GYB14,

GYB18, GYB21, GYB23, GYB25, GYB29) resultaron ser altamente informativos (valores PIC mayores a 0.5), mientras que los 4 primers restantes (GYB6, GYB7, GYB22, GYB27) resultaron ser moderadamente informativos (valores PIC entre 0.25 y 0.5) (Tabla 2).

## **7.4 Análisis de Datos:**

### **7.4.1 Diversidad genética**

Algunos de los parámetros utilizados para medir la diversidad genética de *P.galapageium* fue el número de alelos encontrados en cada una de las subpoblaciones establecidas (Tabla 1), así como los índices de heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y el número de alelos privados. Como se puede observar en la Tabla 3 tanto el número de alelos, como los alelos privados fueron corregidos por rarefacción, con la finalidad de obtener valores más reales y generar subpoblaciones con tamaños de muestra más homogéneas, compensado así los tamaños de muestras desiguales.

De acuerdo con los valores corregidos en la Tabla 3, la subpoblación del Norte (Granillo Rojo y Los Gemelos) presenta la mayor cantidad de alelos (67 alelos), mientras que la subpoblación de Noroeste (Salasaca) presenta la menor cantidad de alelos (39 alelos). En cuanto a los alelos privados corregidos se puede observar que todas las subpoblaciones presentan entre 1 a 7 alelos exclusivos. La subpoblación que más alelos exclusivos presenta es la del Norte (7 alelos privados), mientras que la que menos alelos presenta es la del Noroeste (1 alelo privado).

La heterocigocidad observada ( $H_o$ ) varió en un rango de 0.53-0.61 en las muestras analizadas. El mayor valor de heterocigocidad observada se encontró en la subpoblación del Noreste (Camote y Cerro Mesa) ( $H_o=0.61$ ), mientras que el menor valor se encontró en las subpoblaciones de Noroeste (Salasaca) y Este (Cascajo y Garrapatero) ( $H_o=0.53$ ). Por otro lado, la heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) varió en un rango de 0.45-0.64. El menor valor de heterocigocidad esperada se encontró en la subpoblación del Noroeste (Salasaca) ( $H_e=0.45$ ), mientras que el valor más alto de heterocigocidad esperada se encontró en la subpoblación del Norte (Granillo Rojo y Los Gemelos) ( $H_e=0.64$ ) (Tabla 3).

La heterocigocidad esperada global de la población de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz fue de  $H_e=0.618$ , mientras que la heterocigocidad observada global fue de  $H_o= 0.56$  (Tabla 4). Para determinar la diversidad genética se utiliza el índice de heterocigocidad esperada, el cual se mide en un rango de 0 a 1. Mientras más cercano a 1 es el valor, la diversidad genética es más alta (Donaldson *et al.*, 2015). Debido a que el valor de heterocigocidad esperada es de 0.618, cercano a 1, se puede determinar que la diversidad genética de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz es moderadamente alta. Otros estudios como el de Turchetto *et al.* (2016) también reporta una diversidad moderadamente alta *Petunia secreta* en la cual se obtuvo un valor de heterocigocidad esperada de 0.63 con 15 primers SSR

Mediante el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para conocer en donde se ubica la mayor variación genética, se pudo evidenciar que la mayor variación se encuentra en un 94.72% dentro de las subpoblaciones y en un 5.27% entre las subpoblaciones (Tabla 5).

#### 7.4.2 Agrupamiento de los individuos de acuerdo a su diversidad genética

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado con las subpoblaciones (Figura 2) se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos (mostrados en círculos de color verde, rojo y amarillo). En el grupo de color verde se encuentran mayoritariamente los individuos de las subpoblaciones del Este, Sur Centro y Este. En el grupo de color rojo se encuentran los individuos de las subpoblaciones del Este, Surcentro, Norte, Noroeste y Suroeste. Mientras que en el grupo de color amarillo se encuentran los individuos de las subpoblaciones del Noreste, Surcentro y Este. Por lo tanto, de acuerdo con el gráfico se puede evidenciar que los individuos de las subpoblaciones del Norte, Sur Centro y Este se encuentran distribuidos aleatoriamente en las tres agrupaciones. Por otro lado, se puede evidenciar que los individuos de la subpoblación del Noreste se agrupan mayoritariamente en un solo cuadrante (amarillo).

Por otro lado, se calcularon los valores de  $F_{st}$  (o pairwise  $F_{st}$ ) para conocer el nivel de diferenciación genética entre los individuos de las subpoblaciones de *P.galapageium* de la Isla Santa Cruz. Los valores de  $F_{st}$  se miden en un rango de 0 a 1, donde aquellos valores cercanos a 0 representan una baja diferenciación genética y un alto flujo génico, mientras que los valores cercanos a 1 representan una alta diferenciación genética y un bajo flujo génico (Eguiarte *et al.*, 2010). De acuerdo con los resultados obtenidos, los valores  $F_{st}$  para la población variaron en un rango de 0.014 a 0.118. Lo cual indica que en general existe un alto flujo génico en la población y una baja diferenciación genética. Sin embargo, los valores  $F_{st}$  entre las subpoblaciones de Noroeste vs. Noreste ( $F_{st}=0.1181$ ), Suroeste vs. Noreste ( $F_{st}=0.0802$ ), presentaron

valores ligeramente más altos a diferencia de las otras subpoblaciones, lo cual indicaría una ligera diferenciación genética y un moderado flujo génico (Tabla 6).

Esta baja diferenciación genética entre los individuos de las subpoblaciones de *Psidium galapageium* de la isla Santa Cruz también se vio reflejada al calcular el índice de  $F_{st}$  global. Este índice se mide también en un rango de 0 a 1, donde valores cercanos a 0 indican una baja diferenciación genética, mientras que valores cercanos a 1 indican una alta diferenciación genética entre los individuos de las poblaciones. El valor obtenido en este índice fue de 0.05 (Tabla 7), por lo que al ser cercano a 0 sugiere que entre las subpoblaciones de *P.galapageium* de la isla Santa cruz no existe una diferenciación significativa (Eguiarte *et al.*, 2010).

De acuerdo con el dendrograma de Neighbour Joining (Figura 3) en el cual se reflejan las distancias genéticas entre los individuos de distintas subpoblaciones por medio de la profundidad de las ramas, se pudo observar que las ramas más profundas representan a los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Noreste; por lo cual se presume que estas subpoblaciones se encuentran genéticamente más distantes, en relación a las otras subpoblaciones. Estos resultados permiten confirmar lo obtenido en los valores de  $F_{st}$  con los cuales la mayor diferenciación genética se da también entre los individuos de estas dos subpoblaciones (Tabla 6).

Adicionalmente, se realizó una prueba de Mantel mediante el software Arlequin (Tabla 8) para conocer si existe una relación entre las distancias genéticas y geográficas (Legendre & Fortin, 2010). De acuerdo a los resultados de la prueba se obtuvo un coeficiente de regresión ( $R^2=0.003$ ), el cual, al ser cercano a cero, indica que no hay una

relación entre las distancias genéticas y geográficas. Así mismo los valores para el coeficiente de correlación fueron de  $r=0.407$  y una significancia de valor  $p=0.08$ , por lo tanto, no existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas con un nivel de significancia del 5%.

#### **7.4.3 Análisis de Estructura poblacional**

En relación al análisis bayesiano de estructura poblacional realizado mediante el software STRUCTURE, el K óptimo obtenido fue  $K=2$  ( $\Delta K=1630.22$ ). De acuerdo con el K óptimo se pudo observar la contribución de dos acervos genéticos (representados con el color rojo y verde) en la mayoría de los individuos de las subpoblaciones de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz. Al observar la Figura 4, se puede evidenciar que los individuos de las subpoblaciones del Norte, Surcentro y Este se encuentran representados por los dos acervos genéticos (color rojo y verde), mientras que los individuos de las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste presentan una mayor contribución del acervo genético de color rojo y muy poco del acervo genético de color verde. Por lo tanto, de acuerdo a la Figura 4. se sugiere que existe una cierta diferenciación y mayor estructuración en las subpoblaciones del Noreste, Noroeste y Suroeste en relación a las subpoblaciones del Norte, Este y Surcentro.

#### **7.4.4 Análisis de Endogamia y Parentesco**

Adicionalmente se buscó conocer si entre los individuos de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz existe endogamia y parentesco. Para determinar si existe endogamia entre los individuos se calcularon los coeficientes F promedio y los coeficientes de endogamia  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ . El nivel de endogamia de acuerdo a los coeficientes F promedio,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  se mide en un rango de 0 a 1, donde 0 significa que no existe endogamia entre

los individuos de la población y los apareamientos pueden darse al azar y 1 cuando hay un nivel alto de endogamia entre los individuos de la población (Eguiarte *et al.*, 2010). De acuerdo a las estimaciones basadas en likelihood, se pudo observar en el histograma que la mayor proporción de individuos se encontró en valores de coeficientes F promedio de 0.1-0.2 (Figura 5). Esto se pudo constatar en la gráfica de individuos de *P.galapageium* analizados en la Isla Santa Cruz, en la cual la mayor parte de estos se encontraron en valores F promedio de 0.1-0.2 y solo dos individuos presentaron un coeficiente mayor a 0.4 (Figura 6). Por otro lado, respecto a los coeficientes de endogamia analizados se obtuvo valores bajos cercanos a 0 ( $F_{IS}=0.064$  y  $F_{IT}=0.11$ ) (Tabla 7). Por lo tanto, no existe evidencia de endogamia entre los individuos de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz .

Finalmente, se utilizó el software Coancestry con el objetivo de estimar el parentesco entre los individuos de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz, mediante el cálculo de coeficiente de coancestro ( $\theta_{xy}$ ) descrito por Wang (2002). El coeficiente de coancestro ( $\theta_{xy}$ ) considera a los valores negativos como falta de parentesco y valores positivos como un mayor parentesco entre los individuos analizados (Wang, 2002). De acuerdo con los resultados de coancestría, se obtuvo un valor promedio de  $r=-0.02387$ , el cual sugiere que no existe parentesco entre los individuos analizados. Sin embargo, al realizar las comparaciones entre las subpoblaciones se pudo observar que los individuos del Noreste presentan un nivel ligeramente alto de parentesco entre ellos ( $r=0.24885$ ); mientras que, en las comparaciones entre los individuos de las otras subpoblaciones, los niveles de parentesco son menores a 0,01 o negativos lo cual indica una falta de parentesco (Tabla 9).

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Diseño y amplificación con primers microsatélites específicos para *P. galapageium*

Los marcadores moleculares son herramientas útiles y de gran importancia en estudios de filogenia y genética de poblaciones en plantas. En el caso del género *Psidium* se han reportado varios estudios utilizando marcadores moleculares como RAPD, AFLP, ISSR, SSRs, RFLP (Xiaomei & Guochen, 2012; Valdés-Infante *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2006; Feria-Romero *et al.*, 2009, Kanupriya *et al.*, 2011). Uno de los marcadores moleculares más utilizados son los marcadores microsatélites. Los cuales son ampliamente usados para investigar la estructura genética de poblaciones naturales, debido a las ventajas que presentan, como el ser marcadores codominantes y altamente polimórficos (Sittther *et al.*, 2014). En el presente estudio se realizó por primera vez el diseño y estandarización de primers microsatélites específicos para la especie *P. galapageium*.

Para conocer qué tan informativos fueron los 15 primers microsatélites utilizados en el estudio se calculó el valor PIC de cada uno de ellos. Este valor PIC es un índice utilizado en genética para medir el contenido de polimorfismo en función al número de alelos y las frecuencias alélicas en un locus determinado (Shete *et al.*, 2000). De acuerdo con los resultados de valores PIC, estos oscilaron en un rango entre 0.3 a 0.79 (Tabla 2). Por lo tanto, se obtuvo un set de primers informativos y útiles para realizar estudios de diversidad genética. Estos valores PIC coinciden con otro estudio similar en el cual también se utilizaron primers microsatélites específicos para evaluar la diversidad genética en la especie *Solanum lycopersicum*, y se obtuvieron valores PIC (0.25-0.81) aproximados a los obtenidos en el presente estudio. Estos primers utilizados

también demostraron tener un nivel alto de polimorfismo, lo cual permitió analizar la diversidad genética y alélica de esta especie en diferentes cultivares (Ceballos-Aguirre et al., 2017).

## 8.2 Análisis de datos

### 8.2.1 Diversidad alélica de *P.galapageium*

La riqueza alélica es el número de alelos que un locus en particular puede revelar y es de gran importancia para la determinación de la diversidad genética (Xu, 2010). Mediante el uso de los 15 primers microsatélites específicos para *P.galapageium* se obtuvo un total de 99 alelos en toda la población analizada de la isla Santa Cruz (Tabla 3). Este número de alelos encontrados fue mayor al reportado en *P.galapageium* de la isla Santa Cristóbal (Ponce, 2016), en el cual se obtuvo un total de 25 alelos con primers microsatélites heterólogos diseñados para *P.guajava* (Risterucci et al., 2005).

Al comparar los dos estudios se puede sugerir que con el uso de primers microsatélites específicos se obtuvo una mayor riqueza alélica en relación a los primers heterólogos utilizados por Ponce (2016). De acuerdo con los resultados obtenidos se muestra que, a pesar de la aplicabilidad, transferibilidad y utilidad de los primers heterólogos para identificar diversas especies de *Psidium* (Kanupriya et al., 2011), el uso de primers microsatélites específicos para una especie en particular, como *Psidium galapageium*, es beneficioso ya que se obtiene una mayor exactitud en los análisis genéticos. Esta mayor exactitud obtenida se debe a que los primers microsatélites específicos son diseñados para detectar variaciones más precisas en el genoma de una especie que no podrían ser detectados mediante primers heterólogos (FitzSimmons et al., 1995).

Por otro lado, se debe tomar en consideración que la amplia diferencia del número de alelos obtenido para *P.galapageium* de la isla Santa Cruz puede deberse al número de muestras analizadas y el número de primers utilizados. En el caso de Ponce, (2016) se utilizó un total de 9 primers microsatélites heterólogos con 69 muestras, mientras que en el presente estudio se utilizaron 15 primers microsatélites específicos con un total del 87 muestras de *P.galapageium*. Por lo que se sugeriría realizar posteriores estudios con similar número de muestras y con los mismos 15 primers microsatélites específicos, para obtener una información más clara y certera de la diversidad genética de *P.galapageium* en otras islas del archipiélago.

### **8.2.2 Diversidad genética de *P. galapageium***

La diversidad genética se manifiesta como la variedad de alelos o genotipos presentes en un grupo de estudio, el cual puede ser una población, especies o grupos de especies (Frankham *et al.*, 2010). La diversidad genética es requerida para el potencial evolutivo de las especies en un ambiente cambiante (Holsinger & Gottlieb, 1991). Para medir la diversidad genética se analizan los polimorfismos, la heterocigosidad y la diversidad alélica; estos análisis son necesarios para comparar entre poblaciones y especies, así como predecir cambios en la composición genética de una población (Frankham *et al.*, 2010)

Como se mencionó, uno de estos análisis es la heterocigosidad, la cual está definida como la proporción de individuos heterocigotos en un locus (Allendorf, 1986). Entre más cercano a 1 es el valor de heterocigosidad, hay mayor diversidad genética (mayor número de individuos heterocigotos para cada locus), mientras que más cercano a 0 es el valor, existe una menor diversidad genética (menor número de individuos

heterocigotos para cada locus) (Allendorf, 1986). De acuerdo con los valores obtenidos en este estudio se obtuvo una diversidad genética moderadamente alta ( $He=0.618$ ) (Tabla 4). Al comparar este valor de heterocigosidad esperada con el obtenido en el estudio de *P.galapageium* en la Isla San Cristóbal (Ponce, 2016), se puede observar que el valor de heterocigosidad esperada de *P.galapageium* en Santa Cruz es mayor al obtenido en San Cristóbal ( $He= 0.467$ ), lo cual podría indicar que la diversidad genética de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz es más alta. Sin embargo, al comparar datos entre estudios de diversidad genética se debe tomar en consideración varios factores, como la metodología utilizada, los marcadores moleculares usados, así como el rango geográfico muestreado (Powell *et al.*, 1996; Nybom, 2004). Adicionalmente, esta diferencia de diversidad genética entre las dos islas puede estar relacionado al hecho de que debido a que las islas están separadas por el océano, muchas veces las poblaciones de las islas pueden ser distintas, e incluso las diversidades genéticas para una especie localizada en diferentes islas pueden variar (Maki, 2001). Un ejemplo de esto, se evidenció en el estudio realizado por Martins *et al.* (2013) en el cual se obtuvo que la especie *Piccornia azorica* presentaba distintas diversidades genéticas para cada una de las islas del archipiélago de Azores donde se localizaba. Por lo tanto, en este estudio se comprobó que la diversidad genética de *P.galapageium* en las Islas Galápagos difiere entre islas.

De acuerdo con varios estudios realizados en poblaciones de plantas endémicas en islas, se sabe que la diversidad genética de las mismas tiende a ser relativamente baja, en comparación con otras especies del continente (Crawford *et al.*, 1987; Crawford *et al.*, 1992). Algunos de estos ejemplos se han observado en plantas endémicas de las Islas Bonin: *Crepidiastrum grandicollum*, *Pittosporum beecheyi* y *Symplocos*

*boninensis*, en las cuales la heterocigosidad esperada promedio ha sido  $He=0.020$ ,  $He=0.049$  y  $He=0.038$  respectivamente (Gottlieb, 1981; Stuessy & Ono, 2007). Sin embargo, recientes estudios en la isla de Macaronesia (e.g., Moura *et al.*, 2013; Garcia-Verdugo *et al.*, 2015) han rechazado la hipótesis que las poblaciones de plantas endémicas en islas siempre tienen una baja diversidad genética. De acuerdo con Karron (1987), no todas las especies de plantas endémicas presentan una diversidad genética baja, ya que algunas presentan niveles de diversidad mayores a las especies que se encuentran ampliamente distribuidas. Así mismo, se debe tomar en cuenta que varios factores pueden afectar el nivel y distribución de la variación genética en las especies, como la naturaleza del proceso de especiación, cambios en la población, deriva génica, entre otras (Karron, 1987). Algunos ejemplos de especies endémicas, con niveles de diversidad genética moderadamente alta y alta, se obtuvo en los estudios con marcadores microsatélites en las especies endémicas de la isla de Azores: *Picconia azorica*, en la cual se obtuvo una heterocigosidad esperada de  $He=0.7$  (Martins *et al.*, 2013) y en *Latuca watsoniana* con una heterocigosidad esperada de  $He=0.85$  (Dias *et al.*, 2016).

Por otro lado, al comparar la diversidad genética de *P.galapageium* y *P.guajava* de la isla Santa Cruz, también se evidencia que la heterocigosidad de la especie endémica *P.galapageium* ( $He=0.618$ ) es mayor a la de la especie invasora *P.guajava* ( $He=0.444$ ) (Urquía, 2017). Este resultado es similar al reportado por Ponce (2016) y Ponce (2014) en la isla San Cristóbal, donde la heterocigosidad esperada para *P.galapageium* ( $He=0.467$ ) fue mayor a la de *P.guajava* ( $He=0.205$ ). La mayor diversidad genética en la especie endémica en relación a la encontrada a la especie invasora puede explicarse al hecho de que al ser *P.guajava* una especie invasora, su

diversidad pudo verse afectada por factores como el efecto fundador o cuello de botella durante su introducción en las Islas Galápagos (Lee, 2002).

Asimismo, al analizar las heterocigosidades esperadas para todas las subpoblaciones de *P.galapageium*, se evidenció que fueron moderadamente altas ( $H_e$ : 0,45-0,64) (Tabla 2). Sin embargo, en las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste se obtuvo heterocigosidades ligeramente más bajas en relación a las otras subpoblaciones. Para explicar esta ligera disminución de la heterocigosidad se tendría que analizar a profundidad el efecto de la especie invasora *P. guajava* en las diferentes localidades de Santa Cruz y ver si esta especie está afectando a la diversidad genética de la especie endémica como ha sido reportado en otros casos. En el estudio realizado por Hejda *et al.* (2009) en las especies invasoras *Fallopia spp.* y *Heracleum mantegazzianum* se observó la reducción de la diversidad genética de varias especies endémicas en República Checa.

Adicionalmente, en cuanto a los análisis realizados se observó una ligera variación entre la heterocigosidad global esperada  $H_e=0.618$  y la heterocigosidad global observada  $H_o=0.56$  en *P.galapageium* de la isla Santa Cruz (Tabla 4). De acuerdo con Loeschcke *et al.* (1994) esta diferencia puede estar relacionada a eventos de endogamia; sin embargo, tal como se explicará más adelante el nivel de endogamia en la población estudiada es casi nula. No obstante, es necesario corroborar estos resultados con más estudios acerca de la biología reproductiva de *P.galapageium* que permitan conocer a mayor detalle el tipo de reproducción y si existen eventos de autopolinización en esta especie (Valdebenito, comunicación personal, 2017).

### 8.2.3 Flujo génico de *Psidium galapageium* en la isla Santa Cruz

Los sistemas de islas están separados unos de otros por el océano, el cual actúa como barrera generando que las poblaciones en las islas sean discontinuas, e incluso que presenten características distintas a sus parientes del continente como resultado del aislamiento geográfico y la falta de competencia en las islas (Crawford *et al.*, 1987; Maki, 2001). Es por esto que para comprender de mejor manera los efectos del aislamiento geográfico en la evolución de las plantas en sistemas insulares, se requiere realizar análisis de genética de poblaciones estimando tanto la diversidad genética, como el flujo de genes que existe en una población (Maki, 2001). El flujo génico, en términos generales, se refiere al movimiento de genes de una población a otra (Eguiarte *et al.*, 2010). Este flujo génico permite la introducción de alelos nuevos en una población o cambiar la frecuencia de alelos, independientemente de su valor adaptativo (Curtis & Schneck, 2008). En sistemas insulares, de acuerdo con Maki (2001), este flujo de genes tiende a ocurrir más fácilmente entre poblaciones de una misma isla que entre aquellas que se encuentran en distintas islas. El flujo génico es una fuerza importante en la evolución, puesto que tiende a reducir las diferencias entre las poblaciones previniendo que las mismas evolucionen en diferentes especies (Slatkin, 1987).

Para analizar el flujo génico entre los individuos de las poblaciones, se calculan los valores  $F_{st}$ , los cuales permiten estimar la proporción de variación genética que están entre individuos de las poblaciones o subpoblaciones en relación a las frecuencias diferenciales de los alelos (Curtis & Schneck, 2008). Al analizar los resultados del presente estudio se evidenció que en general el flujo génico entre los individuos de las distintas subpoblaciones de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz es alto, de acuerdo con los valores pairwise  $F_{st}$  y  $F_{st}$  global obtenidos (Tabla 6 y Tabla 7). El alto flujo génico

indica que existe un continuo movimiento de genes entre los individuos de las distintas subpoblaciones y una baja diferenciación genética entre los mismos. Estos resultados son similares a lo reportado en *P.galapageium* de la isla San Cristóbal (Ponce, 2016) en el cual los valores  $F_{st}$  obtenidos también eran cercanos a cero (0.018-0.192), lo cual indicaba una baja diferenciación genética y un alto flujo de genes. De acuerdo con Eguiarte *et al.* (2010) hay que tomar en consideración que cuando el estudio contempla una menor área geográfica (como en el caso de islas), se espera que la diferenciación genética sea baja. Asimismo, de acuerdo con Setoguchi & Watanabe (2000) los sistemas de islas presentan áreas más pequeñas de extensión; por lo tanto, las especies endémicas se encuentran distribuidas en simpatría o de manera adyacente, generando el aumento del flujo génico, así como al apareamiento aleatorio entre los individuos de la misma especie. Es por esto que al ser Santa Cruz una isla pequeña de aproximadamente 1000 km<sup>2</sup> de extensión (Carvajal, 2016), se puede evidenciar que los individuos de *P.galapageium* presentan una baja diferenciación genética, ya que se encuentran en un constante intercambio de genes debido a un posible apareamiento aleatorio o mediante la dispersión de semillas.

Como se mencionó, un aspecto importante que puede contribuir a un alto flujo génico es la presencia de dispersores de semillas. De acuerdo con un estudio de dispersión de semillas en las islas Galápagos realizado por Blake *et al.* (2012), las tortugas de Galápagos dispersan las semillas tanto de *P.guajava* como de *P.galapageium* a través de las excretas. Debido a que las tortugas se movilizan desde las tierras altas hasta las tierras bajas de la isla Santa Cruz podrían estar contribuyendo al flujo génico de los individuos de *P.galapageium*, ya que esta especie se encuentra ubicada principalmente en estas zonas.

Por otro lado, algunos estudios realizados en *P.guajava* en la isla Santa Cruz, señalan que los principales dispersores de semillas son las aves, ratas y animales domésticos como caballos, cabras y cerdos (Heleno *et al.*, 2012). No obstante, no se puede concluir que estos dispersores de semillas de *P.guajava* sean los mismos para *P.galapageium*. Por lo tanto, es necesario realizar más estudios de dispersión de semillas en *P.galapageium* para comprender cómo este aspecto está influenciando en el flujo génico de esta especie, así como el tipo de reproducción que presenta (Valdebenito, comunicación personal, 2017).

#### **8.2.4 Agrupamiento de los individuos de acuerdo a su diversidad genética**

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado para la población de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz, se sugieren tres agrupaciones formadas por los individuos muestreados a lo largo de la isla (Figura 2). Estas tres agrupaciones observadas presentan un número heterogéneo de individuos. Los individuos de las subpoblaciones del Norte, Este y Sur Centro se encuentran distribuidos aleatoriamente en las tres agrupaciones. Los individuos del Noreste en su mayoría están agrupados en un solo cuadrante (grupo de color amarillo). La mayoría de los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Suroeste solo se agrupan en el grupo de color rojo. Esto implicaría que en estos grupos (Noreste, Noroeste y Suroeste) seguramente hay una mayor diferenciación. En cuanto al dendrograma, de acuerdo a la profundidad de las ramas se ve que existe una mayor separación entre los individuos del Noreste con los del Noroeste y Suroeste (Figura 3).

Debido a que no se observó una relación en la prueba de Mantel que indique que entre más distantes se encuentran las subpoblaciones, más diferentes son genéticamente (Tabla 8). Una posible hipótesis que podría explicar esta diferenciación genética entre las subpoblaciones del Noroeste y Suroeste con la del Noreste, podría relacionarse a los cambios altitudinales en la isla Santa Cruz. Los cambios en la altitud son importantes en la isla Santa Cruz puesto que generan microambientes, los cuales presentan precipitaciones y condiciones del suelo distintas en relación a la altura (Humme, 1993).

De acuerdo con varios estudios de suelos llevados a cabo en la isla Santa Cruz desde 1962 (Rial *et al.*, 2017; Stoops, 2014), se ha evidenciado que las composiciones de suelo varían con respecto a la altura. Los suelos que se encuentran a 200-300 metros de altura sobre el nivel del mar presentan un pH más básico, una menor saturación de bases, menor cantidad de compuestos como Ti, Mn, Ni y Ba,  $Fe_2O_3$  y no presentan esmectita. A diferencia de los suelos que se encuentran a 400-500 msnm los cuales presentan un pH más ácido, mayor saturación de bases, presencia de esmectita, así como mayor cantidad de compuestos como Ti, Mn, Ni y Ba,  $Fe_2O_3$  (Stoops, 2014). Así mismo, los niveles de precipitación también varían con respecto a la altura, puesto que a menor altura se presenta una menor precipitación, mientras que a mayor altura existe una mayor precipitación y el clima se vuelve más frío y nublado (Humme, 1993).

De acuerdo con la altura de la recolección de muestras, se pudo evidenciar que las muestras de la subpoblación del Noreste, fueron recolectadas aproximadamente a 400-500 metros de altura. Mientras que las muestras de las subpoblaciones del Suroeste y Noroeste fueron recolectadas aproximadamente a los 200-300 metros de altura (Anexo 2). Por lo que se sugiere que debido a que las condiciones de los

microambientes son diferentes entre las subpoblaciones del Noreste con las del Noroeste y Suroeste, esto pudo haber causado que, a lo largo de la evolución, los individuos de estas subpoblaciones adquirieran cierta diferenciación genética que les permitió adaptarse a las condiciones de cada microambiente donde habitan.

Esta diferenciación genética entre individuos de una especie debido a los cambios altitudinales y condiciones de los microambientes, también se evidenció en estudios realizados por Premoli (2003) en la especie *Nothofagus pumilio*, Murawski & Hamrick (1990) en la especie *Aechmea magdalenae* y Byars *et al.* (2009) en la especie *Poa hiemata*.

#### **8.2.5 Estructura poblacional de *P.galapageium***

La estructura poblacional, la historia evolutiva, así como los orígenes de *P.galapageium* son muy poco conocidos en la actualidad. Por lo tanto, mediante este estudio se buscó identificar la estructura poblacional de esta especie en la isla Santa Cruz.

Un primer indicio que permitió conocer si existe o no una estructura poblacional, fue el análisis de AMOVA (Tabla 5). De acuerdo con este análisis se sugirió que existe una escasa estructura poblacional, puesto que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las subpoblaciones (94.73%). Es decir que existe un continuo intercambio de genes entre los individuos dentro de las subpoblaciones de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz.

Esta escasa estructura poblacional también se confirmó al realizar el análisis mediante el uso del método de inferencia bayesiana con el software Structure (Pritchard

*et al.*, 2004). En base a los resultados obtenidos, el K óptimo fue igual a 2 ( $\Delta K=1630.22$ ) (Figura 4), el cual indica que existen dos posibles acervos genéticos (representados con los colores rojo y verde) que se encuentran contribuyendo en los individuos de las subpoblaciones de la isla Santa Cruz. Habría que analizar si estos dos linajes ancestrales que se observan podrían estar relacionados con las dos variedades de la especie *Psidium galapageium* reportadas para Santa Cruz: la variedad *howellii* y la variedad *galapageium* (Porter, 1968; McMullen, 1999). Se conoce que estas dos variedades se encuentran localizadas en la isla Santa Cruz, a diferencia de otras islas, donde solamente se encuentra una de las variedades (Jaramillo-Diaz *et al.*, 2017; Jørgensen *et al.*, 1999; Lawesson *et al.*, 1987; Porter, 1968; Porter, 1983; Tropicos.org. *et al.*, 2009; Wiggins *et al.*, 1971). No se conoce con certeza la distribución exacta de estas dos variedades en la isla Santa Cruz, por lo cual se sugiere realizar mayores estudios morfológicos e identificar en qué localidades de la isla se encuentran estas variedades. Con esta información se podría tener una idea más clara de la estructura poblacional de *P.galapageium* en esta isla.

Por otro lado, se debe considerar que, en las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste se observa una mayor contribución del acervo de color rojo a diferencia de las otras subpoblaciones. Esto sugeriría que existe una ligera diferenciación de las subpoblaciones del Noreste, Noroeste y Suroeste con respecto a las otras subpoblaciones. Una posible hipótesis que explique esta mayor contribución del acervo de color rojo en los individuos de las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste podría estar relacionado con los cambios climáticos que sucedieron en el pasado (Humme, 1993). De acuerdo con varios estudios, se sugiere que hace 15000 años, las islas sufrieron una gran sequía, lo cual generó cambios en la vegetación, así

como una mayor oxidación y aridez del suelo en varios lugares tanto de las tierras altas como de las tierras bajas (Collins *et al.*,2013). Debido que los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Suroeste se encuentran ocupando parte de las tierras bajas, y los individuos del Noreste se encuentran ocupando parte de las tierras altas, estos cambios en el clima, así como también en el suelo, pudieron haber generado una presión selectiva sobre ciertos alelos. Lo cual pudo cambiar el genotipo de los individuos de estas subpoblaciones en relación a los otros, permitiendo que exista una mayor adaptación a estas condiciones. No obstante, debido a la falta de información que existe, para poder probar esta hipótesis es necesario realizar más estudios acerca de la historia evolutiva de *P.galapageium*.

Adicionalmente, esta ligera diferenciación genética de los individuos de las subpoblaciones del Noreste, Noroeste y Suroeste en relación a los individuos de las otras subpoblaciones, también podría estar relacionada a los alelos privados encontrados. Al analizar las frecuencias alélicas de los alelos privados de estas subpoblaciones se pudo evidenciar que las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste presentaron un mayor número de alelos privados con frecuencias alélicas altas (mayores al 5%), a diferencia de las otras subpoblaciones (Tabla 3). Estos resultados podrían explicar que exista una mayor diferenciación de estas subpoblaciones con respecto a las otras. Esto alelos privados podrían estar relacionados con características importantes para la adaptación a cambios ambientales (Romdhane *et al.*, 2017).

Por lo tanto, de acuerdo a los análisis realizados se sugiere que existe una cierta diferenciación de las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste; sin embargo, no

se observa una estructura poblacional totalmente definida para la población de *Psidium galapageium* de la isla Santa Cruz.

### 8.2.6 Análisis de endogamia y parentesco

La endogamia es el apareamiento entre individuos genéticamente emparentados que produce un incremento en la frecuencia de homocigotos (Carroll & Fox, 2008). A pesar de que en la actualidad solo se conoce el tipo de reproducción de menos del 20% de la flora de Galápagos (no incluye *P.galapageium*), de acuerdo a algunos estudios, muchas de las especies estudiadas son autocompatibles y no dependen enteramente de polinizadores para producir semillas, lo cual genera una alta ocurrencia de endogamia (McMullen, 1987). En estudios de especies endémicas de Galápagos como en *Solanum galapagense* se han encontrado altas tasas de endogamia (Pailles *et al.*, 2017). Esta estrategia es muy común en otros sistemas insulares atribuida principalmente a la fauna pobre de polinizadores en comparación con el continente (Barrett, 1996). Sin embargo, los altos niveles de endogamia pueden causar una baja diversidad genética en los individuos de una especie, así como perder alelos que afecten a su fitness. Lo cual resulta ser perjudicial para la supervivencia de la especie frente a los efectos ambientales, pudiendo ocasionar muchas veces la extinción de la misma (Frankham *et al.*, 2002).

De acuerdo con los resultados de endogamia obtenidos, se pudo evidenciar que tanto los coeficientes de endogamia  $F$  promedio (0.1-0.2) representados en el histograma y en el gráfico de individuos (Figura 5 y 6), así como el coeficiente de endogamia dentro de las subpoblaciones ( $F_{IS}=0.064$ ) y el coeficiente de endogamia total ( $F_{IT}=0.11$ ) (Tabla 7) arrojaron valores cercanos a 0. Por lo tanto, de acuerdo a estos

valores se sugiere que no existe endogamia entre los individuos de *Psidium galapageium* de la isla Santa Cruz.

Estos resultados de endogamia obtenidos en *P.galapageium* difieren con los evidenciados en el estudio realizado en *P.guajava* de la Isla Santa Cruz, en el cual sí se encontraron niveles moderadamente altos de endogamia en relación a los coeficientes  $F$  analizados (Urquía, 2017). Esta endogamia pudo confirmarse con el tipo de reproducción que presenta *P.guajava*, el cual se da mediante autopolinización y reproducción vegetativa (Binggeli, *et al.*, 1998).

A pesar de que las flores de *P.galapageium* son bisexuales (Valdebenito, comunicación personal, 2017), de acuerdo con estos estudios se sugeriría que los individuos de *P.galapageium* buscan otra forma de reproducción. Sin embargo, debido a que no se tiene una amplia información de esta especie, no se puede llegar a conclusiones claras sobre su tipo de reproducción.

Por otro lado, el conocer más acerca de las relaciones entre individuos dentro de las poblaciones es muy importante para estudios de genética cuantitativa, genética de la conservación y otras áreas de ecología y evolución (Ritland, 1996,2000; Lynch & Ritland, 1999). Para complementar con los resultados obtenidos se realizó un análisis de parentesco entre los individuos de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz mediante el software de Coancestry (Wang, 2011). Este programa permite estimar la relación o parentesco entre los individuos de una población que no se conoce muy bien su historia genealógica (Wang, 2011). De acuerdo con Frankham *et al.* (2002) cuando existe un nivel alto de parentesco entre los individuos de las poblaciones, las poblaciones tienden a encontrarse aisladas lo cual puede generar endogamia entre los individuos.

De acuerdo con los resultados obtenidos se obtuvo un valor global de coancestro negativo, lo cual indicaría que en su mayoría los individuos de la población no estarían emparentados (Tabla 9). Al analizar las comparaciones de los individuos de las diferentes subpoblaciones, se observó que la mayoría presentaron valores negativos y valores cercanos a cero (menores a 0.1), lo cual indica una falta de parentesco entre los individuos (Wang, 2002). Tanto esta falta de parentesco como de endogamia en los individuos de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz, permitiría tener una idea acerca de la calidad de la población (Charlesworth, 2003; Weir *et al.*, 2006). Puesto que esta falta de endogamia como de parentesco podría estar contribuyendo a la alta diversidad genética encontrada en este estudio, la cual podría estar generando un mayor fitness en la población y que ésta se encuentre más saludable.

Por otro lado, en los individuos de la subpoblación Noreste se obtuvo un valor ligeramente alto de parentesco ( $r=0.248$ ), a diferencia de las demás subpoblaciones. Lo cual podría sugerir que aparentemente los individuos de esta subpoblación se encuentran más emparentados entre ellos y presentan una ligera diferenciación con los individuos de las otras subpoblaciones. Este mayor parentesco podría estar relacionado a un posible aislamiento genético de los individuos de esta subpoblación debido a factores geográficos, climáticos, falta de dispersión de semillas o polinizadores en esta región (Hatzikotoulas *et al.*, 2014). De igual manera se debe considerar que el parentesco entre los individuos puede generar un incremento de homocigosis, reducir el fitness en la descendencia y generar una baja adaptación a cambios ambientales (Weir *et al.*, 2006). Por lo tanto, para comprobar este evento es necesario realizar más estudios acerca de la geografía, condiciones ambientales, dispersión de semillas y polinizadores

en las localidades del Noreste y comparar con las otras subpoblaciones, para saber qué está sucediendo entre los individuos de esta subpoblación.

## 9. CONCLUSIONES

- Este trabajo reporta por primera vez el diseño de primers microsátélites (SSR) específicos para *P.galapageium*. Se obtuvo 15 primers microsátélites específicos polimórficos los cuales pueden ser utilizados en estudios de diversidad genética de *P.galapageium* en otras islas.
- La heterocigosidad esperada de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz fue de  $He=0.619$ , mayor a la heterocigosidad esperada en la misma especie en la isla San Cristóbal  $He=0.467$  (Ponce, 2016)
- La heterocigosidad esperada del *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz es mayor que la reportada para la *P.guajava* ( $He=0.444$ ) en esta isla (Urquía, 2017).
- De acuerdo con los valores  $F_{st}$  analizados, se evidencia un alto flujo génico entre los individuos de la población de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz y una baja diferenciación genética entre los mismos, con excepción de los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Noreste en las que se obtuvo una diferenciación genética moderada.
- De acuerdo a los análisis de PCoA y dendrograma de distancias genéticas se sugiere que los individuos de la subpoblación del Noreste se encuentran genéticamente más distantes a los individuos de las subpoblaciones del Noroeste y Suroeste.
- No se observa una estructura poblacional definida para la mayoría de los individuos de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz, pero si se reconocen dos acervos genéticos en la mayoría de los individuos muestreados.
- No hay evidencia de endogamia y parentesco en la población de *P.galapageium* de la Isla Santa Cruz.

## 10. RECOMENDACIONES

- En el presente estudio se tomó en consideración la diploidía de *P.galapageium*, en base a análisis realizados en *P.galapageium* de la isla San Cristóbal (Ponce, 2016). Esta diploidía fue utilizada para realizar los diferentes análisis de datos. Sin embargo, es importante realizar más análisis y pruebas como cromatografía líquida o conteo de cromosomas para confirmar la ploidía de esta especie.
- Para futuras investigaciones con muestras de *P.galapageium* se recomienda el uso de seroalbúmina bovina (BSA) para optimizar la amplificación de muestras, puesto que resulta un buen aditivo aumentando la actividad de la polimerasa y actúa en contra de inhibidores que pueden afectar la PCR.
- Para futuros estudios, se recomienda agrupar a las subpoblaciones en base a los grupos observados en el PCoA y realizar los análisis genéticos efectuados en el presente estudio, con el fin de evidenciar si existe una mayor diferenciación genética entre las subpoblaciones del Noroeste, Noreste y Suroeste.
- Se recomienda realizar más estudios sobre la distribución, ecología, polinización, dispersores de semillas y reproducción de *P.galapageium* para complementar los análisis realizados.
- Se recomienda realizar estudios de diversidad genética de *P.galapageium* en otras islas de Galápagos con el uso de los primers específicos diseñados, para comparar con los resultados obtenidos en la isla Santa Cruz y conocer de manera más amplia la situación actual de esta especie.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Allendorf, F. (1986). Genetic Drift and the Loss of Alleles Versus Heterozygosity. *Zoo Biology* 5: 181-190
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite Markers. *Molecular Ecology* 11:155-165
- Barrett SCH. (1996) The reproductive biology and genetics of island plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences*. 1996; 351:725–733.
- Binggeli, P., Hall, J. B., & Healey, J. R. (1998). A review of invasive woody plants in the tropics. *School of Agricultural and Forest Sciences* 13.
- Blackett, M., Robin, R., Good, R., Lee, S. & Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources* 12: 456-463.
- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghayobi, E. & Jaramillo, P. (2012). Seed dispersal by Galápagos tortoises. *Journal of Biogeography*, 39(11), 1961–1972.
- Byars, S.G., Parsons, Y., Hoffmann, A.A. (2009) Effect of altitude on the genetic structure of an Alpine grass, *Poa hiemata*. *Annals of Botany* 103: 885–899.
- Botstein, D., W. R., S. M., & D. R. (1980). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet*, 32, 314-331.
- Brewington, L. (2011). The Politics of Invasion: Defining and Defending the Natural, Native and Legal in the Galápagos Islands of Ecuador. *Chapel Hill*, 111-113.
- Caruso, G., Broglia, V. & Pocovi, M. (2015). Genetic diversity. Importance and applications in plant breeding. *Lhawet/Nuestro entorno* 4(1): 4-50.
- Carroll, S. & Fox, C. (2008). *Conservation Biology*. Evolution in Action. New York: Oxford University Press.
- Carvajal, C. (2016). Santa Cruz: Media Luna, Los Gemelos, El Chato, Zona de Pampa, y carretera vía a Baltra. Obtenido el 25 de febrero 2018 de [http://www.carlospi.com/galapagospark/programas/parque\\_nacional\\_introducidas\\_plantas\\_santa\\_cruz.html](http://www.carlospi.com/galapagospark/programas/parque_nacional_introducidas_plantas_santa_cruz.html)
- Castoe, T., Poole, A., Koning, J., Jones, K., & Tomback, D. (2012). Rapid microsatellite identification from Illumina Paired-end Genomic sequencing in two birds and snake. *PloSOne*, 7(2), e30953.

- Ceballos-Aguirre, N., López, W., Orozco-Cárdenas, M., Morillo, Y. & Vallejo-Cabrera, F. (2017). Use of microsatellites for evaluation of genetic diversity in cherry tomato. *Campinas* 76(2): 220-228
- Charlesworth, D. (2003). Effects of inbreeding on the genetic diversity of populations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* (2003) 358: 1051–1070
- Chen, T., Chang-Chai, Ng., Wang, C. & Shyu, Y. (2006). Molecular Identification and Analysis of *Psidium guajava* L. from Indigenous Tribes of Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 15, No. 1: 82-88
- Chiriboga, R., Fonseca, B., & Maignan, S. (2006). Desarrollo de políticas y estrategias de manejo del sector Agropecuario y su relación con las especies introducidas en la Provincia de galápagos. *Proyecto ECU/00/G31*, 1-86.
- Cimadom, A., Causton, C., Cha, D., Damiens, D., Fessl, B., Hood-Nowotny, Lincango, P., Miele, A., Nemeth, E., Semler, E., Teale, A. & Tebbich, S. (2016). Darwin's finches treat their feathers with a natural repellent. *Scientific Reports* 6: 1-9
- Collins, A., Bush, M. & Sachs, J. (2013). Microrefugia and species persistence in the Galápagos highlands: A 26,000-year paleoecological perspective. *Frontiers in genetics* 4 (269): 1-17
- Cornel, R. (2016). *Non-native Species and Their Role in the Environment: The Need for a Broader Perspective*.
- Crawford, D.J., Stuessy, T.F., Haines, D.W., Cosner, M.B., Silva, M & Lopez, P. (1992). Allozyme diversity within and divergence among four species of *Robinsonia* (Asteraceae: Senecioneae), a genus endemic to the Juan Fernandez Islands, Chile. *American Journal of Botany*, 79: 962-966
- Crawford, D.J., Whitkus, R. & Stuessy, T.F. (1987). *Plant evolution and speciation on oceanic islands*. In *Patterns of Differentiation in Higher Plants*. London: Academic Press.
- Curtis, H. & Schnek, A. (2008). *Biología*. México D.F.: Editorial Médica Panamericana
- DeVienne, D. (2003). *Molecular Markers in Plant Genetics and Biotechnology*. CRC Press.
- Dias, E., Moura, M., Schaefer, H. & Silva, L. (2016). Geographical distance and barriers explain population genetic patterns in an endangered island perennial. *AoB Plants*: 1-61
- Donaldson, P., Daly, A., Ermini, L. & Bevitt, D. 2015. *Genetics of Complex Disease*. London: Garland Science.
- Dudley J. (1993). Molecular markers in plant improvement: manipulation of genes affecting quantitative traits. *Crop Science* 33(4):660-68.

- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Eckhardt, R.C. (1972) Introduced plants and animals in Galapagos Islands. *Bioscience* 22: 585-590.
- Eguiarte, L., Aguirre-Planter, E., Scheinvar, E., González, A., & Souza, V. (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Universidad Nacional Autónoma de México*, 2-28.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567.
- Falque M & Santoni S. (2007). Molecular markers and high-throughput genotyping analysis. In: Morot-Gaudry J-F, Lea P, Briat J-F, editors. Functional plant genomics: *Taylor & Francis Group, LLCp*. 503–27.
- Feria-Romero, I., Astudillo-Dela, H., Chavez-Soto, M., Rivera-Arce, E., Lopez, M., Serrano, H., & Lozoya, X. (2009). RAPD markers associated with quercetin accumulation in *Psidium guajava*. *Bio. Plant* 53:125–128.
- FitzSimmons, N., Moritz, C.& Moore, S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol Biol Evol.*12(3):432-40.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2010). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press.
- Frankham, R., Ballou, J., & Briscoe, D. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Garcia-Verdugo C, Sajeva M, La Mantia T, Harrouni C, Msanda F, Caujapé-Castells J (2015) Do island plant populations really have lower genetic variation than mainland populations? Effects of selection and distribution range on genetic diversity estimates. *Molecular Ecology*, 24(4):726-41.
- Glowka, L., Burhenne-Guilmin, F. & Synge, H. (1996). Guía del Convenio sobre Diversidad Biológica. Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales. *Environment Policy and Law Paper* 30, 179pp.
- Gostimsky, S.A., Kokaeva, Z.G. & Konovalov, F. A. (2005). *Studying Plant Genome Variation Using Molecular Markers*.
- Gottlieb, L.D. (1981). Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 64:161-180

- Gradstein, S. & Weber, W. (1982). Bryogeography of the Galapagos Islands. *Journ. Hattori Bot. Lab* 52: 127-152.
- Griffiths, S. (2013). *Isolating microsatellite markers in the marine sponge Cinachyrella alloclada for use in community and population genetics studies*. Tesis para el título de MPhil Environmental Biology. University of Manchester.
- Guichoux, E., Lagache, S., Warner, S., Chaumeil, P., Leger, P., & Lepais, O. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resource*, 11:591-611.
- Hamann, O. (1984) *Changes and threats to the vegetation. Key Environments. Galápagos (ed. R. Perry)*. pp. 115–131, Pergamon Press, Oxford.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd edn. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, MA.
- Hatzikotoulas, K., Gilly, A. & Zeggini, E. (2014) Using population isolates in genetic association studies. *Brief Funct Genomics*. 2014 Sep;13(5):371-7.
- Hejda, M., Pysek, P. & Jarosík, V. (2009). Impact of invasive plants on the species richness, diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology* 97: 393–403.
- Heleno R., Olesen, J, Nogales, M., Vargas, P & Traveset, A. (2012). Seed dispersal networks in the Galapagos and the consequences of alien plant invasions. Proc RHolsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 195–208.
- Holsinger, K. E., & Gottlieb, L.D. (1991). *Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects*. In D. A. Falk and K. E.
- Humme, M. (1993) Galapagos, a Natural History. Canada: University of Calgary in plants. *The plant genome* 1(1):5-20.
- Huxel, G. R. (1999). Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hybridization. *Biological Conservation*, 89(2), 143–152.
- International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN). (1996). *The Red List of Threatened Species*. IUCN.
- Itow, S. (2003) Zonation pattern, succession process and invasion by aliens in species poor vegetation of the Galápagos Islands. *Global Environmental Research* 7:39–58.
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* (Oxford, England), 23(14), 1801–1806.

- Jaramillo, P., Guézou, A., Mauchamp, A. & Tye, A. (2012). *CDF checklist of Galapagos flowering plants*. In *Charles Darwin Foundation Galapagos species checklist* (eds F Bungartz, H Herrera, P Jaramillo, N Tirado, G Jimenez-Uzcátegui, D Ruiz, A Guézou, F Ziemmeck). Puerto Ayora, Galapagos: Charles Darwin Foundation.
- Jaramillo Díaz, P., & Guézou, A. (2013). *CDF Checklist of Galapagos Vascular Plants-FCD Lista de especies de Plantas Vasculares de Galápagos*. Charles Darwin Foundation.
- Jaramillo Díaz, P., Guézou, A., Mauchamp, A., Tye, A. (2017). *CDF Checklist of Galapagos Flowering Plants - FCD Lista de especies de Plantas con flores Galápagos*. In: Bungartz, F., Herrera, H., Jaramillo, P., Tirado, N., Jiménez-Uzcátegui, G., Ruiz, D., Guézou, A. & Ziemmeck, F. (eds.). Charles Darwin Foundation: <http://darwinfoundation.org/datazone/checklists/vascular-plants/magnoliophyta/> Last updated: 21 Jul 2017
- Jørgensen, P.M., León-Yáñez, S. (eds.) (1999) *Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden 75. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, 1181 pp.
- Joshi, S.P et al. (1999) Molecular markers in plant genome analysis. *Curr Sci* 77:230-240.
- Kalinowski, S. T. (2005). HP-RARE 1.0: A computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. *Molecular Ecology Notes*, 5, 187–189.
- Kanupriya, P., Latha, M., Aswath, C., Reddy, L., Padmakar, B., Vasugi, C., y otros. (2011). Cultivar Identification and Genetic Fingerprinting of Guava (*Psidium guajava*) Using Microsatellite Markers. *International Journal of Fruit Science*, Vol 11: 184-196.
- Karron, J. D. (1987). A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47–58.
- Kordrostami, M. & Rahimi, M. (2015). Molecular Markers in Plants: Concepts and Applications. *Gene3m*: 4024-403.
- Koressaar, T. & Remm, M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289–1291.
- Kricher, J. C. (2006). *Galápagos: A Natural History*. Princeton, Estados Unidos: Princeton University Press.
- Lawesson, J.E., Adersen, H. & Bentley, P. (1987) An updated and annotated check list of the vascular plants of the Galapagos islands. Rept. Bot. Inst., *Univ. Aarhus* 16: 1-74.

- Lawesson, J.E. (1990) *Alien plants in the Galápagos Islands, a summary*. *Botanical Research in the Galápagos Islands* (eds J.E. Lawesson, O. Hamann, G. Rogers, G. Reck & H. Ochoa). pp. 15–20, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 32, Botanical Garden Press, St Louis, MO.
- Lee, C. (2002). Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology and Evolution*: 386-391.
- Legendre, P. & Fortin, M.J. (2010). Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources* 10:831-844
- Loeschcke, V., Tomiuk, J. & Jain, S. (2013). *Conservation Genetics*. Berlin: Birkhäuser
- Lohse M, Bolger AM, Nagel A, Fernie AR, Lunn JE, Stitt M, Usadel B & Robi NA. (2012). A user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic Acids Res* (40) (Web Server issue), W622-7.
- López-Caamal, A., Cano-Santana, Z., Jiménez-Ramírez, J., Ramírez-Rodríguez, R., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Is the insular endemic *Psidium socorrense* (Myrtaceae) at risk of extinction through hybridization? *Plant Systematics Evolution*, 1960-1970.
- Lynch, M. & Ritland, K. (1999). Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152: 1753–1766.
- Maki, M. (2001). Genetic Differentiation within and among Island Populations of the Endangered Plant *Aster miyagii* (Asteraceae), an Endemic to the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany*, 88: 2189-2194.
- Martins JM, Moreira OCB, Sardos J, Maciel MGB, Silva L, Moura MMT. (2013). Population genetics and conservation of the Azorean tree *Picconia azorica*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 2013; 49:135–143.
- Masuelli, R. (1999). Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de especies hortícolas. *Avances en Horticultura* 4 (1): 54-66.
- Mauchamp, A. (1997). Threats from alien plant species in the Galapagos Islands. *Conservation Biology*, 11, 260–263.
- McMullen CK. (1987). Breeding systems of selected Galápagos Islands angiosperms. *American Journal of Botany*. 74:1694–1705.
- McMullen, C. (1999). *Flowering Plants of the Galápagos*. New York: Cornell University Press.
- Monaco, T. & Sheley, R. (2012). *Invasive Plant Ecology and Management: Linking Processes to Practice*. Cambridge: CABI.

- Moura M, Silva L, Caujapé-Castells J (2013) Population genetics in the conservation of the Azorean shrub *Viburnum treleasei* Gand. *Plant Systematics and Evolution* 299(10): 1809–1817.
- Mueller-Dombois, D. & Fosberg, F.R. (2013). *Vegetation of the Tropical Pacific Islands*. Springer Science & Business Media.
- Mukhopadhyay, T. & Bhattacharjee, S. (2016). Genetic Diversity: Importance and Measurements. *Research India Publications*: 251-295.
- Murawski, D. y Hamrick, J. (1990). Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *Amer. J. Bot.* 9: 1201-1208.
- Nogueira, A., M., Ferreira, A., & Ferreira, M. F. da S. (2016). Transferability of Microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* Species (Myrtaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 249–256.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol.* 13(5):1143-55.
- Pailles, Y., Ho, S., Pires, I., Tester, M., Negrão, S. & Schmöckel, S. (2017). *Genetic Diversity and Population Structure of Two Tomato Species from the Galapagos Islands*. *Front. Plant Sci*
- Paterson, A.H. (1996). *Making genetic maps*. In: Paterson AH, editor. *Genome mapping in plants*: R.G. Landes Company. 23–39.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28, 2537-2539.
- Ponce, M. J. (2014). *Estudio preliminar de la diversidad genética de la guayaba, Psidium guajava, en 6 localidades de la isla San Cristóbal, Ecuador*. Disertación (Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos), Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Ponce, S. M. (2016). *Determinación de la diversidad genética del guayabillo (Psidium galapegiium) y comparación con la diversidad genética encontrada en la guayaba (Psidium guajava) en la Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador*. Disertación (Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos), Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Porter, D. (1822). *Journal of a cruise made to the Pacific Ocean*: Volume one. Upper Saddle River: Gregg Press.
- Porter, D.M. (1968). *Psidium* (Myrtaceae) in the Galápagos Islands. *Ann. Missouri Bot. Gard*, Vol 55: 368-371.

- Porter, D.M. (1983) *Vascular Plants of the Galapagos: Origins and Dispersal*. In: Bowman, R.I., Berson, M. & Leviton, A.E. (eds.): Patterns of evolution in Galápagos organisms. Pacific Division, AAAS, San Francisco, California, p. 33-96
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. (1996) The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding*. 1996; 2:225–238
- Premoli, A. (2003). Isozyme Polymorphisms Provide Evidence of Clinal Variation with Elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity* 94 (3): 218–226.
- Pritchard, J. (2004). *STRUCTURE* (Versión 2.3.4) [Software]. Stanford University.
- Queller, D.C. et al., (1993) Microsatellites and kinship. *Trends Ecol Evol* 8:285–288.
- Randell, R., Howarth, D. & Morden, C. (2004). Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Rubus* (Rosaceae) species in Hawaii. *Conservation Genetics* 5: 217-230
- Rial, M., Martínez, A., Taboada, T., Rodríguez-Lado, L. (2017). Soil organic carbon stocks in Santa Cruz Island, Galapagos, under different climate change scenarios. *Catena* 156(2017): 74-81
- Risterucci, A., Duval, M.-F., Rohde, W., & Billotte, N. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5, 745–748.
- Ritland, K. (2000). Marker-inferred relatedness as a tool for detecting heritability in nature. *Mol. Ecol.* 9: 1195–1204.
- Ritland, K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and inbreeding coefficients. *Genet. Res.* 67: 175–186.
- Romdhane, M., Riahi, L., Selmi, A., Jardak, R., Bouajila, A., Ghorbel, A. & Zoghalmi, N. (2017). Low Genetic Differentiation and Evidence of Gene Flow among Barley Landrace Populations in Tunisia. *Crop Sci.* 57:1585–1593.
- Rosenberg, N. A. (2004). *distruct*: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1):137–138.
- RStudio Team (2015). *RStudio: Integrated Development for R (Versión 3.4.2)* [Software]. RStudio, Inc. Obtenido el 20 de enero 2018 de <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>.
- Saghai-Marooif, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., & Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 8014–8018.

- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234
- Schulman, A. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica* 158: 313-321. *Soc B* 280: 20122112.
- Schwengel DA, Jedlicka AE, Nanthakumar EJ, Weber JL, Levitt RC (1994). Comparison of fluorescence-based semi-automated genotyping of multiple microsatellite loci with autoradiographic techniques. *Genomics*, 22:46–54.
- Setoguchi, H., & Watanabe, I. (2000). Intersectional Gene Flow between Insular Endemics of *Ilex* (Aquifoliaceae) on the Bonin Islands and the Ryukyu Islands. *American Journal of Botany*, Vol.87: 793-810.
- Shete, S., T. H. & Elston, R., (2000). On Estimating the Heterozygosity and Polymorphism Information Content Value. *Theoretical Population Biology*, 57:265-271.
- Sitther, V., Zhang, D., & H. D. (2014). Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genet Resources Crop Evol*, 1-11.
- Slatkin, M. (1987). Gene Flow and the Geographic Structure of Natural Populations. *Science* (236):786-791
- SoftGenetics LLC. (2012). *Software GeneMarker* ® [Software]
- Stoops, G. (2014). Soils and Paleosoils of the Galápagos Islands: What We Know and What We Don't Know, A Meta-Analysis. *Pacific Science* 68 (1): 1-17
- Stuessy, T. & Ono, M. (2007). *Evolution and Speciation of Island Plants*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Tautz D. & Renz M. (1984) Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Res* 12:4127–4138
- Torres, M. & Mena, C. (2018). *Understanding Invasive Species in the Galapagos Islands: From the Molecular to the Landscape*. Gewerbestrasse: Springer.
- Tropicos.org. (2009) *Database of Missouri Botanical Garden*. Missouri Botanical Garden, <http://www.tropicos.org>.
- Turchetto, C., Segatto, A., Mäder, G., Rodrigues, D., Bonatto, S. & Freitas, L. (2016). High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: Implications for conservation. *Annals of Botany* (2016):1-53
- Tye, A. (2006). Can we infer island introduction and naturalization rates from inventory data? Evidence from introduced plants in Galápagos. *Biological Invasions* 8 (2): 201-215.

- Tye, A. (2001). *Invasive plant problems and requirements for weed risk assessment in the Galápagos islands*. En Groves, R. H., Panetta, F. D., & Virtue, J. G. (Eds.), *Weed risk assessment* (pp. 153–175). Melbourne, Australia: CSIRO Publishing.
- Tye, A., M.C. Soria, and M.R. Gardener. (2002). *A strategy for Galápagos weeds*. In *Turning the tide: The eradication of invasive species*, eds. C.R. Veitch, and M.N. Clout, 336-341. Gland: Invasive Species Specialist Group, International Union for the Conservation of Nature.
- Tye, A. (2007). *The status of the endemic flora of Galapagos: the number of threatened species is increasing*. Galapagos Report 2006-2007. Recuperado el 10 de abril del 2018 desde: <https://www.galapagos.org/wp-content/uploads/2012/04/biodiv1-status-of-endemic-flora.pdf>
- Urquía, D. (2017). *Estudio de la diversidad genética de la población invasora de Psidium guajava en la isla Santa Cruz, Galápagos*. Disertación (Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de Licenciado en Biología), Universidad San Francisco de Quito, Ecuador.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* 40: e115.
- Valdebenito, H. (Diciembre 2017). (Andrea Soria Entrevistador)
- Valdés-Infante, J., Velazquez, B., Gonzalez, G. (2003). Molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava* L.), establishment of a first molecular linkage map and mapping of QTLs for vegetative characters. *Journal of Genetics and Breeding*. 57. 349-357.
- Veitch, C. R. & Clout, M. N. (2002). *Turning the Tide: The Eradication of Invasive Species: Proceedings of the International Conference on Eradication of Island Invasives*. Auckland: IUCN.
- Velasco, M. (2002). *Percepciones de la población de Galápagos sobre las especies introducidas y el Sistema de Inspección y Cuarentena para Galápagos (SICGAL)*. Parque Nacional Galápagos y Fundación Charles Darwin.
- Walsh, S., McCleary, A., Mena, C., Shao, Y., Tuttle, J., González, A. & Atkinson, R. (2007). QuickBird and Hyperion data analysis of an invasive plant species in the Galapagos Islands of Ecuador: Implications for control and land use management. *Remote Sensing of Environment* 112 (2008): 1927-1941.
- Walter, K. & Gillet, H. (1998). *1997 IUCN Red List of Threatened Plants*. Cambridge: IUCN
- Wang, J. (2002). An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. *Genetics* 160: 1203-1215.

- Wang, J. (2011). COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11(1): 141-145.
- Wang, J. (2014). Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *EVOL. BIOL.* 27 (2014): 518–530
- Weir, B., Anderson, A. & Hepler, A. (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews* 7: 771-781
- Wiggins, I.L., Porter, D.M. (1971) *Flora of the Galapagos Islands*. Stanford University Press, Stanford.
- Winter, P. & Kahl, G. (1995). Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 11(4):438-48.
- Wright, S. (1978) *Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations*. The University of Chicago Press, Chicago.
- Xiaomei, L. & Guochen, Y. (2012). Assessment of clonal fidelity of micro-propagated guava (*Psidium guajava*) plants by ISSR markers [online]. *Australian Journal of Crop Science*, Vol. 6 (2): 291-295.
- Xu, Y. (2010). *Molecular Plant Breeding*. México D.F.: CABI
- Zhu C, Gore M & Buckler ES, Yu J. (2008). Status and prospects of association mapping. *The Plant Genome* 1(1):5-20

## TABLAS

**Tabla 1.** Localidades de la isla Santa Cruz agrupadas en subpoblaciones siguiendo el criterio de las subpoblaciones realizadas por Urquía, (2017).

Subpoblaciones	Localidades
Norte	Granillo Rojo
	Los Gemelos
Noroeste	Salasaca
Noreste	Camote
	Cerro Mesa
Este	Cascajo
	Garrapatero
Sur Centro	Bellavista
	Tomás de Berlanga
	Los Guayabillos
	Occidente
	Parque Artesanal
	Eliás Cando
Suroeste	Manzanillo
	Chato
	Caseta
	Pájaro Brujo

**Tabla 2.** 15 marcadores microsátélites seleccionados junto con las secuencias forward y reverse, temperatura de *annealing* estandarizada, fluoróforo utilizado, tamaño esperado de fragmento y valores PIC.

Primer	Secuencias Forward y Reverse	T° de Annealing estandarizada	Fluoróforo utilizado	N° de alelos	Expected Size	PIC
GYB3	F: GCCTCCCTCGCGCCAAAAAGTCAAATAAAGCCGCCTACG R: AGGTTACTCTAATGCCCTTTCGG	60°C	6FAM	5	482-498	0,67
GYB4	F: GCCTCCCTCGCGCCAGTAGGCTTTGAAAAATTCTCATCCG R: CTTATGGAGGCAAATTCGATCAGG	65°C	VIC	3	359-380	0,54
GYB5	F: GCCTCCCTCGCGCCACACAAGTATCGTGCTACCAAATCG R: GGCGGATATGCAAAATATATGATCG	63°C	NED	6	329-356	0,54
GYB6	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCTACCTAAGTGTGGAAAGAGAACG R: GGAAACCACTCGTGAGTATTACAGC	64°C	VIC	6	364-394	0,3
GYB7	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCAGGCAAGAACAGATAGAGATCG R: TCTTCTCAACAACCAGATTCTCACC	64°C	PET	5	311-329	0,41
GYB8	F: GCCTCCCTCGCGCCAATGGCCGGAAGAATCAAATCC R: CATCTCTCATCTTGTTCACATCC	67°C	6FAM	7	316-340	0,54
GYB9	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCTCTGTTAATCTGGGCTTTGC R: CTCCTTCACAAAATTCACACTGACC	67°C	VIC	6	290-305	0,55
GYB14	F: GCCTCCCTCGCGCCAATCCACTTTCATATCATGCAAGACC R: TGCACAAATGTATCCTCTTAAGTGC	66°C	NED	11	302-326	0,77
GYB18	F: GCCTCCCTCGCGCCAAGTATTCGATCGAGTCTATGGG R: AGAGCCCTAAGGACTTAGAGAATGC	60°C	PET	11	364-400	0,79
GYB21	F: GCCTCCCTCGCGCCACCGATTCTGGTAAGGAGAGAGG R: TGTTGTAGTTGTAGGTCATGTCG	57°C	PET	6	257-278	0,68
GYB22	F: GCCTCCCTCGCGCCAATGAAGATCAACCTTCTCCATTGC R: AGTAATGACTCCGGTCAGCTTCC	60°C	VIC	7	287-311	0,48
GYB23	F: GCCTCCCTCGCGCCACTTAAATTTCCGTCTCTCTCTCG R: ACAAATCCACGGTAATGTATGAGC	64°C	6FAM	7	325-349	0,55
GYB25	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCCAGCAAATCAAATTTATCCC R: GGACCGATCAAATCTTCTAAACC	63°C	6FAM	5	332-341	0,6
GYB27	F: GCCTCCCTCGCGCCATCTTGATGAACCAAGACCTACTGC R: CCAAACACAAGATAACGAACCTTCC	67°C	NED	8	316-352	0,5
GYB29	F: GCCTCCCTCGCGCCATTTGTCGGGACTCTCTAATGGC R: GAGGTTACGTAGAATCTTGTATGTGC	65°C	PET	6	312-336	0,63

**Tabla 3.** Parámetros utilizados para medir la diversidad genética de *P. galapageium* en Isla Santa Cruz. Para cada subpoblación se calculó el número de individuos muestreados por localidad, el número de alelos encontrados, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), número de alelos privados, frecuencias alélicas y número de alelos privados corregidos con rarefacción.

Subpoblación	Nº de individuos	Nº de alelos	Nº alelos con rarefacción	$H_e$	$H_o$	Alelos privados con rarefacción	Alelos privados	Frecuencias alélicas de alelos privados
Norte	14	68	67	0,64	0,57	7	7	0.03, 0.07, 0.1, 0.04, 0.04, 0.03, 0.03
Noroeste	5	39	39	0.45	0,53	1	1	0.2
Noreste	9	46	47	0.47	0,61	6	6	0.06, 0.11, 0.06, 0.06, 0.06, 0.06
Este	12	57	57	0.60	0,53	3	1	0.04
Sur Centro	34	75	63	0.60	0,56	6	10	0.01, 0.04, 0.01, 0.01, 0.07, 0.04, 0.01, 0.03, 0.03, 0.03
Suroeste	13	61	63	0.55	0,54	5	3	0.04, 0.46, 0.08

**Tabla 4.** Índices globales de heterocigosidad obtenidos para los 87 individuos de *P.galapageium* muestreados en la Isla Santa Cruz

<b>Heterocigosidad esperada</b>	0,618
<b>Heterocigosidad observada</b>	0,56

**Tabla 5.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) realizado para los individuos de *P.galapageium* de la Isla Santa Cruz

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Varianza de componentes	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	55,2	0,2488	5,27
Dentro poblaciones	739,5	4,4712	94,73
Total	794,7	4,72035	

**Tabla 6.** Valores  $F_{st}$  obtenidos para individuos de *P. galapageium* agrupados en 6 subpoblaciones Norte (Granillo Rojo, Los Gemelos), Noroeste (Salasaca), Noreste (Camote, Cerro Mesa), Este (Cascajo y Garrapatero), Surcentro (Bellavista, Tomás de Berlanga, Los Guayabillos, Occidente, Parque Artesanal y Elias Cando), Suroeste (Manzanillo, Chato, Caseta, Pájaro Brujo).

	Norte	Noroeste	Noreste	Este	Sur Centro	Sur Oeste
Norte	0.000					
Noroeste	0.05591730	0.000				
Noreste	0.05496980	0.11817923	0.000			
Este	0.04926725	0.06206924	0.06028655	0.000		
Sur Centro	0.02817766	0.02850181	0.02684493	0.01481822	0.000	
Sur Oeste	0.04607285	0.03868792	0.08028453	0.05827104	0.03491800	0.000

Valores entre 0-0.05= baja diferenciación genética. Valores entre 0.05-0.15= moderada diferenciación genética. Valores entre 0.15-0.25= alta diferenciación genética (Wright, 1978; Hartl & Clark, 1997; Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

**Tabla 7.** Valores  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$  globales calculados para la población de *P. galapageium* de la Isla Santa Cruz

$F_{ST}$	0,05
$F_{IS}$	0,064
$F_{IT}$	0,11

$F_{st}$ = Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (0 si no hay diferenciación genética entre las poblaciones y 1 si son completamente distintas las poblaciones).  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ = Coeficientes de endogamia (0 si no hay endogamia y 1 alto índice de endogamia) (Eguiarte *et al.*, 2010).

**Tabla 8.** Valores obtenidos con prueba de Mantel para la población de *P. galapageium* de la Isla Santa Cruz

Coeficiente de regresión	0,00325
Coeficiente de correlación	0,40723
p-value	0,078

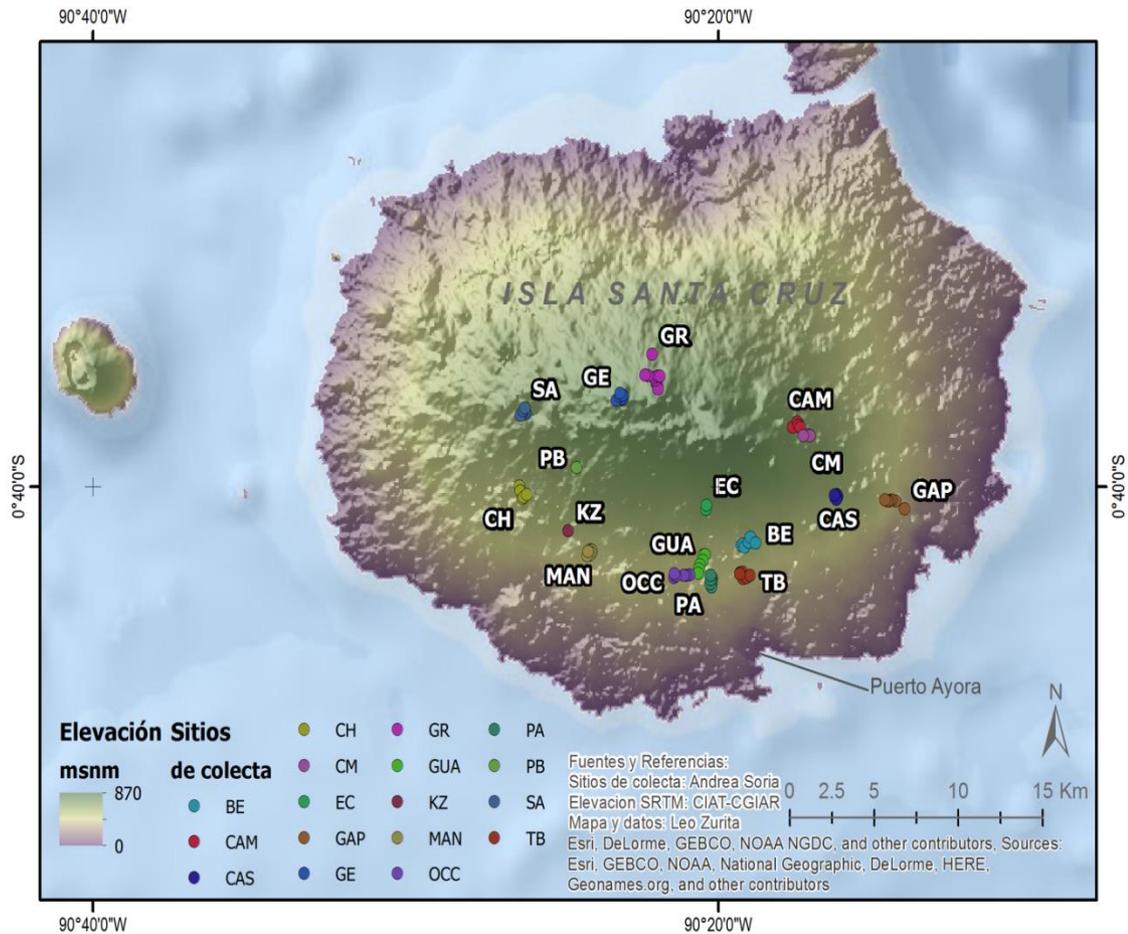
$R^2$ = Coeficiente de regresión (valor de 0 o cercanos a 0 no existe una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica).  $R$ =coeficiente de correlación (valor numérico en el que el incremento de una variable explica a otra). Valor  $P$ = menores a 5% (0.05) de significancia no se rechaza la  $H_0$ , mayores a 5% de significancia se rechaza la  $H_0$  (Legendre & Fortin, 2010).

**Tabla 9.** Coeficientes de coancestría obtenidos mediante el método de Wang para los individuos de *P.galapageium* de la Isla Santa Cruz mediante el software *Coancestry*

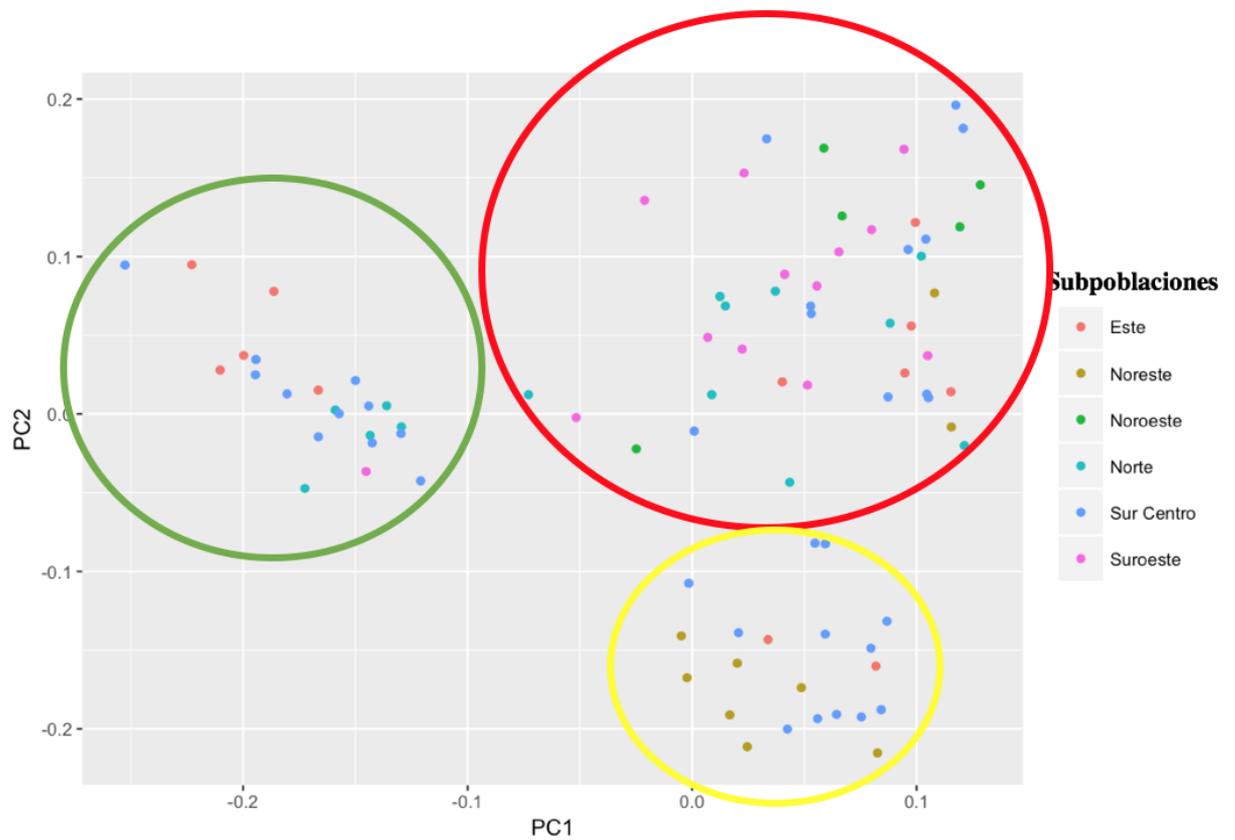
	<b>Norte</b>	<b>Noroeste</b>	<b>Noreste</b>	<b>Este</b>	<b>Sur Centro</b>	<b>Sur Oeste</b>
<b>Norte</b>	-0,09226					
<b>Noroeste</b>	0,02164	-0,08538				
<b>Noreste</b>	0,01666	0,01864	0,24885			
<b>Este</b>	-0,06949	-0,02268	-0,01873	0,01883		
<b>Sur Centro</b>	-0,06747	-0,00776	0,05099	-0,04868	-0,0324	
<b>Sur Oeste</b>	-0,08441	0,08951	0,00261	-0,0445	-0,02708	0,07438
<b>Valor de coancestría promedio:-0.02387</b>						

Valores negativos o menores que 0.25 indican un bajo índice de parentesco (Wang, 2014).

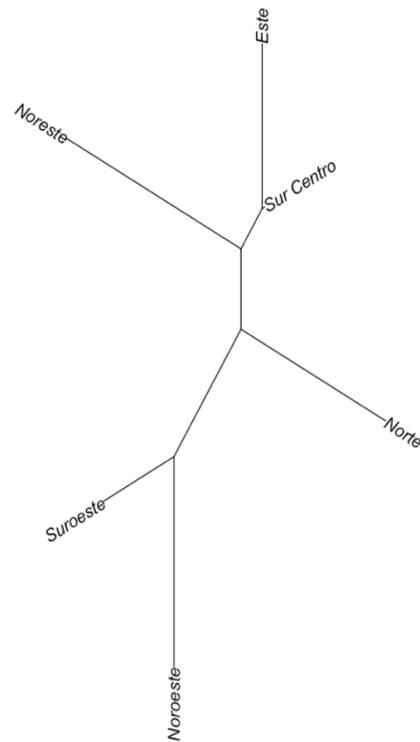
## FIGURAS



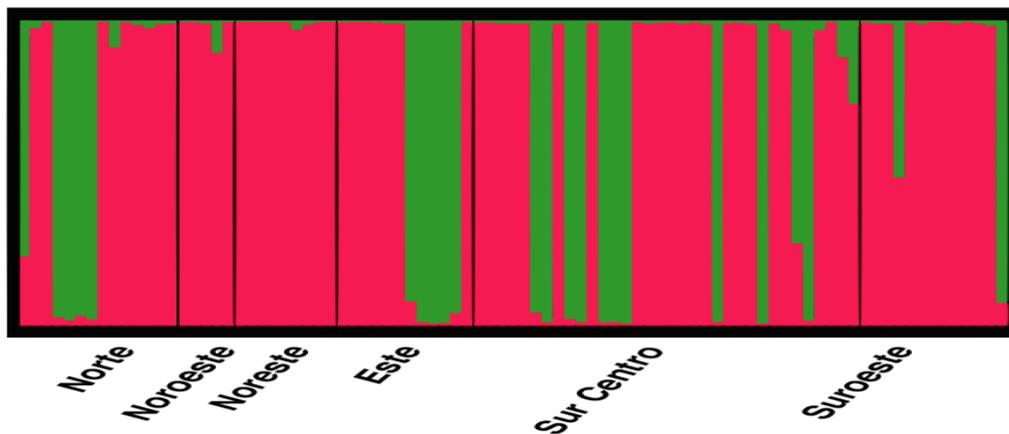
**Figura 1.** 93 muestras recolectadas en 17 localidades de la Isla Santa Cruz, Galápagos: GR:Granillo Rojo, GE:Los Gemelos, SA:Salasaca, CAM:Camote, CM:Cerro Mesa, CAS:Cascajo, GAP:Garrapatero, BE:Bellavista, TB:Tomás de Berlanga, PA:Parque Artesanal, GUA: Los Guayabillos, OCC:Occidente, MAN:Manzanillo, PB:Pájaro Brujo, EC:Elias Cando , CH:Chato, KZ:Caseta. Mapa realizado por Leo Zurita



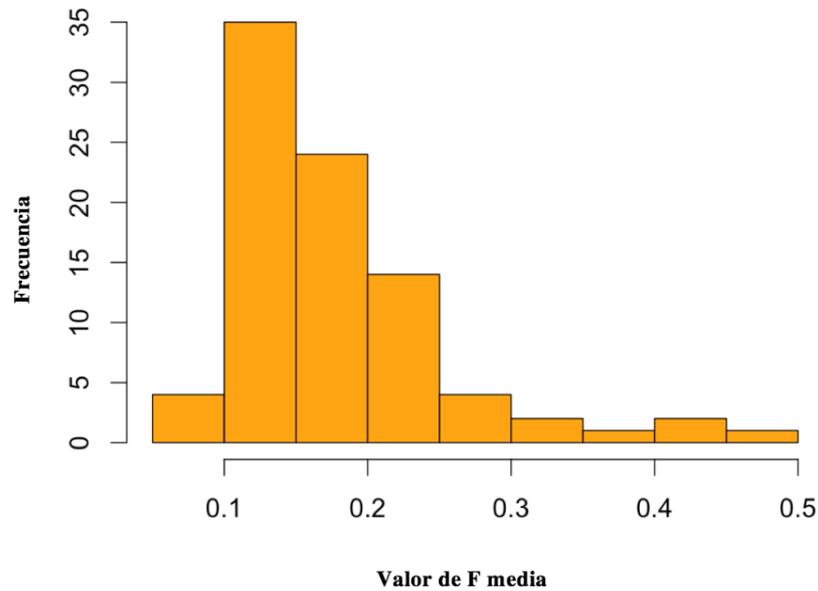
**Figura 2.** PCoA de los individuos de *P. galapageium* muestreados en la Isla Santa Cruz. Cada color representa a las 6 subpoblaciones. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos representados con los colores amarillo, rojo y verde. Individuos de las subpoblaciones del Suroeste y Noroeste se encuentran en el grupo de color rojo. Individuos de la subpoblación de Noreste se encuentran en el grupo de color amarillo. Los individuos de las subpoblaciones Sur, Centro, Norte y Este se encuentran distribuidos aleatoriamente en las tres agrupaciones (amarillo, rojo y verde).



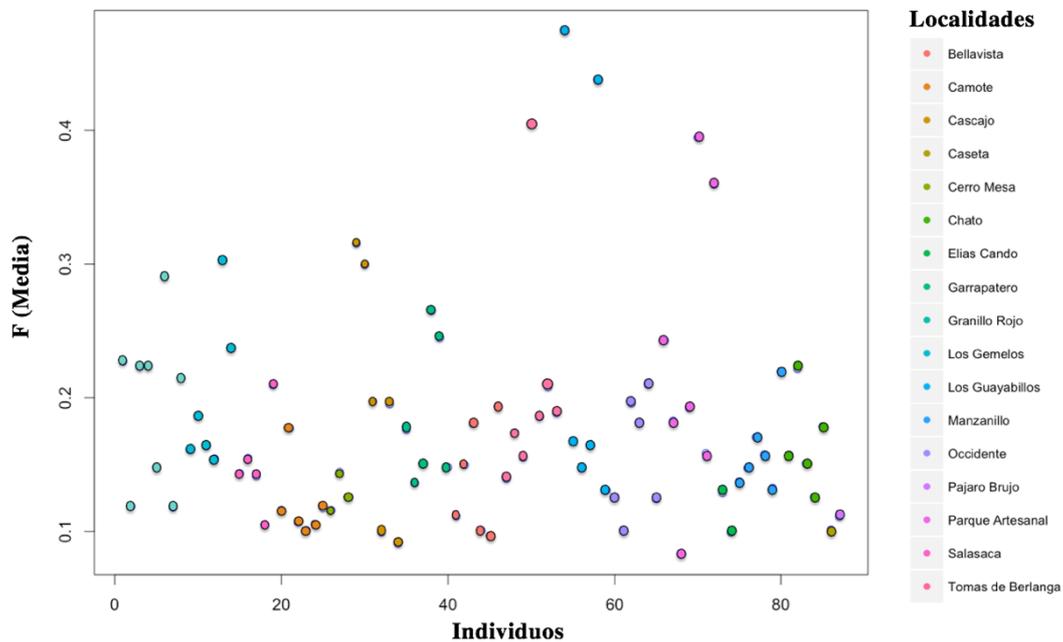
**Figura 3.** Dendrograma obtenido mediante el método de Neighbor Joining (NJ) de los individuos de las 6 subpoblaciones de *P. galapageium* en la isla Santa Cruz. Las distancias genéticas entre los individuos de las subpoblaciones se reflejan en la longitud de las ramas. Las subpoblaciones del Noroeste y Noreste presentan ramas más alargadas a diferencia de las otras subpoblaciones.



**Figura 4.** Estructura poblacional obtenida mediante software STRUCTURE de los 87 individuos muestreados en la Isla Santa Cruz agrupados en 6 subpoblaciones con un valor óptimo de  $K=2$ . Los valores de  $K$  corresponden al número de acervos genéticos (representados con diferentes colores).

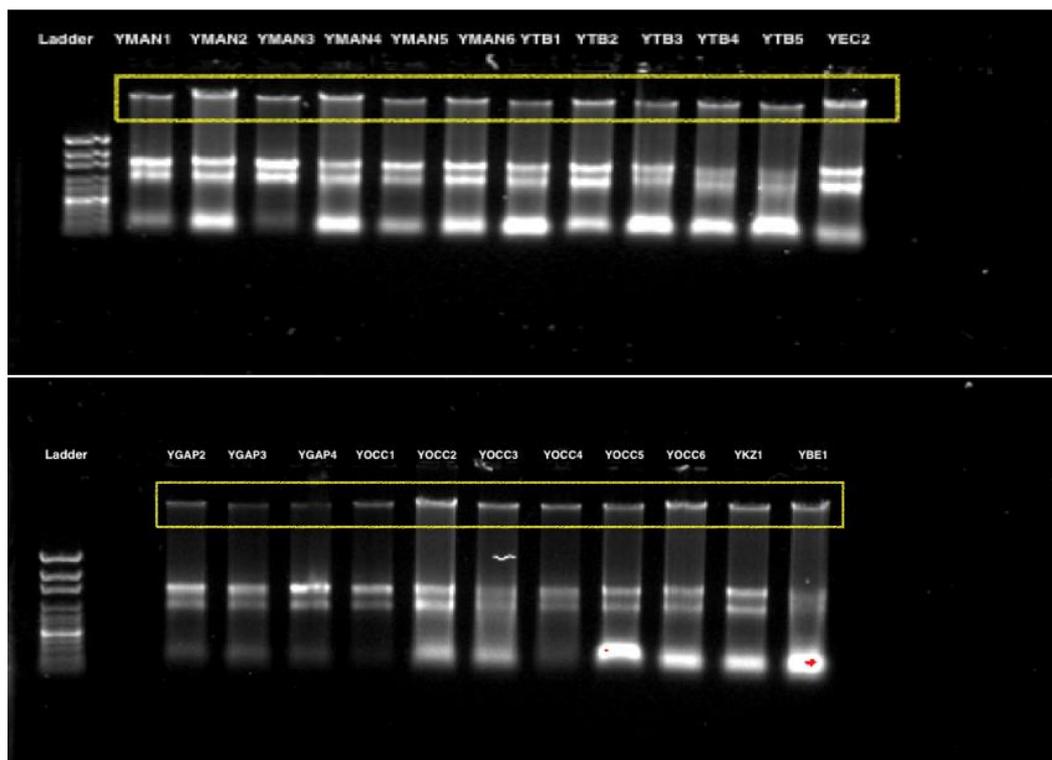


**Figura 5.** Frecuencia de los coeficientes de endogamia F (promedio) observados en los 87 individuos de *P. galapageium* muestreados en Santa Cruz, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio=0.1-0.2), lo cual indica que no hay endogamia en la población.



**Figura 6.** Gráfica de los coeficientes de endogamia F de obtenido de los 87 individuos de *P. galapageium* muestreados en la Isla Santa Cruz. Cada punto representa un individuo y cada color su localidad. La mayoría de los individuos se distribuyen en un rango menor de 0.4, lo cual indica que no hay endogamia en la población.

## ANEXOS



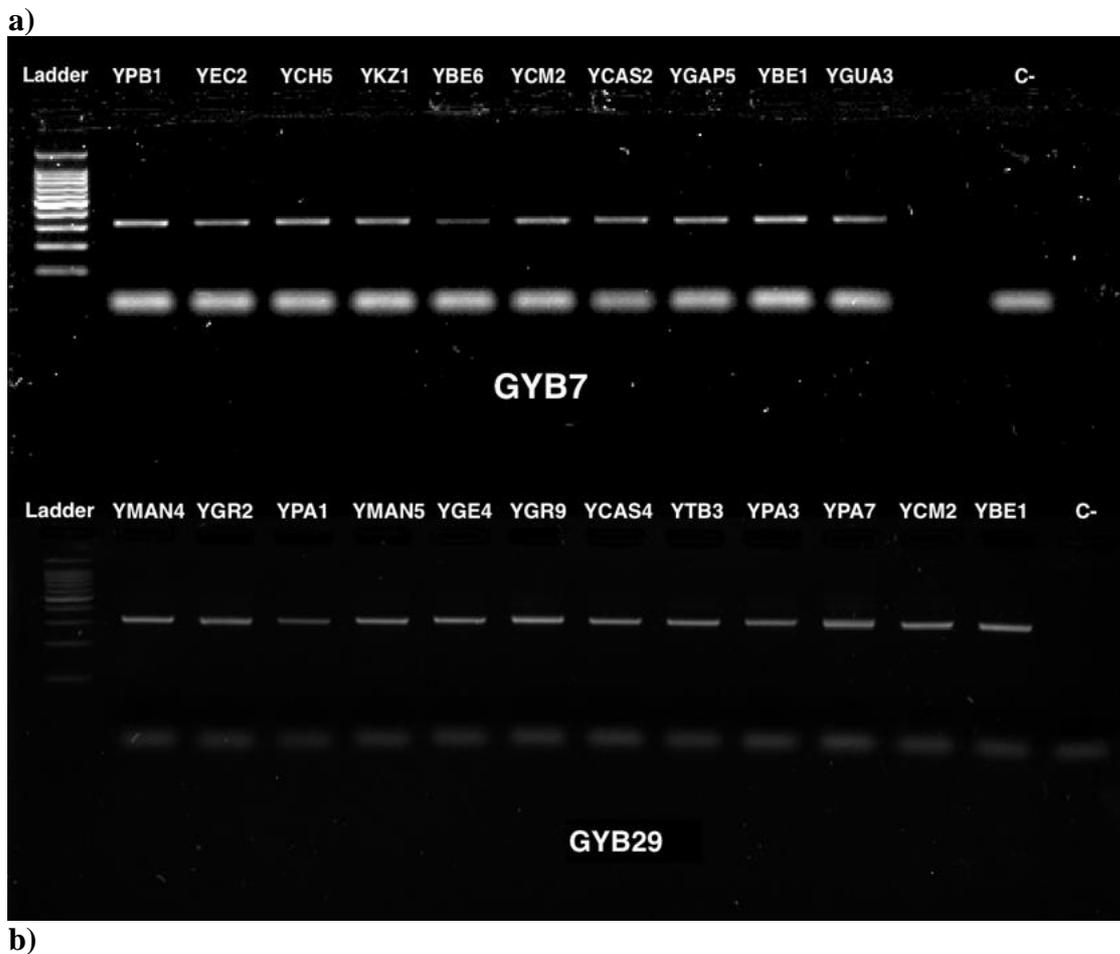
**Anexo 1.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar el ADN extraído de muestras de *P.galapageium* de las localidades de Manzanillo (YMAN), Tomás de Berlanga (YTB), Elias Cando (YEC), Garrapatero (YGAP), Occidente (YOCC), Caseta (YKZ) y Bellavista (YBE). Ladder 100pb (Invitrogen).

**Anexo 2.** 93 muestras recolectadas de 17 localidades en la Isla Santa Cruz, calidad de ADN, cuantificación (ng/UL), coordenadas de recolección y altura de las muestras sobre el nivel del mar. En amarillo se encuentran las muestras seleccionadas para la amplificación.

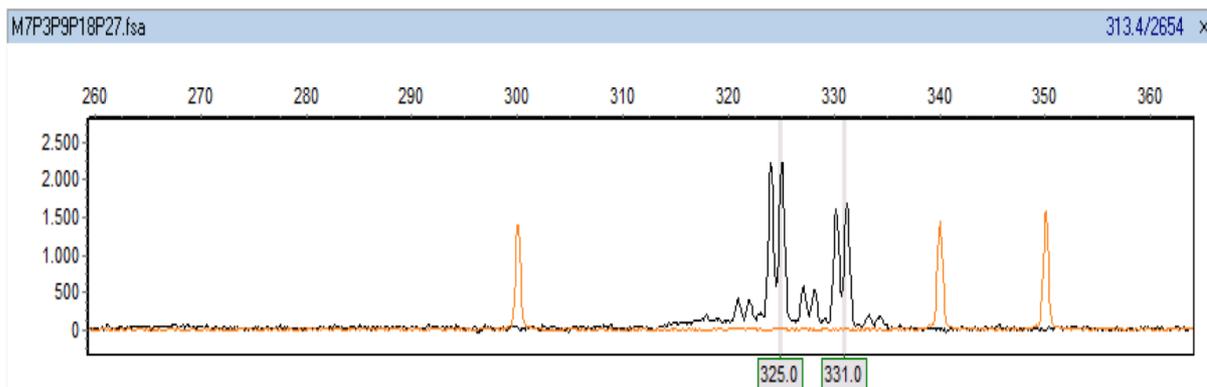
Localidad	Nombre muestra	ADN	Cuantificación ng/UL	Coordenadas	Altura sobre el nivel del mar
Granillo Rojo	YGR1	Buena	179,9	S 00 37.120 W 090 21.984	216
	YGR2	Buena	375,7	S 00 37.158 W 090 21.960	625
	YGR3	Buena	523,4	S 00 37.267 W 090 21.926	627
	YGR4	Buena	237,6	S 00 37.009 W 090 22.024	602
	YGR5	Buena	563,4	S 00 36.931 W 090 22.048	588
	YGR6	Buena	487	S 00 36.904 W 090 21.945	565
	YGR7	Buena	427,7	S 00 36.911 W 090 21.862	565
	YGR8	Buena	597,4	S 00 36.298 W 090 22.117	572
	YGR9	Buena	207,3	S 00 36.888 W 090 22.252	564
	YGR10	Buena	489	S 00 36.880 W 090 22.346	567

Los Gemelos	YGE1	Buena	946,7	S 00 37.486 W 090 23.027	617
	YGE2	Buena	334,6	S 00 37.558 W 090 23.092	617
	YGE3	Buena	523,3	S 00 37.547 W 090 23.123	623
	YGE4	Buena	343,1	S 00 37.568 W 090 23.257	605
	YGE5	Buena	606,7	S 00 37.466 W 090 23.159	618
	YGE6	Buena	584,8	S 00 37.440 W 090 23.066	617
	YGE7	Buena	387,3	S 00 37.389 W 090 23.148	620
Salasaca	YSA1	Buena	494,6	S 00 37.957 W 090 26.149	374
	YSA2	Buena	231,9	S 00 37.916 W 090 26.188	380
	YSA3	Buena	363,8	S 00 37.899 W 090 26.261	382
	YSA4	Buena	298,1	S 00 38.010 W 090 26.333	365
	YSA5	Buena	456,8	S 00 37.876 W 090 26.246	386
	YSA6	Buena	144,8	S 00 37.803 W 090 26.194	388
Camote	YCAM1	Buena	78,7	S 00 38.264 W 090 17.508	426
	YCAM2	Buena	337,6	S 00 38.298 W 090 17.552	419
	YCAM3	Buena	331,5	S 00 38.327 W 090 17.627	426
	YCAM4	Buena	455,4	S 00 38.191 W 090 17.478	441
	YCAM5	Buena	228,1	S 00 38.279 W 090 17.448	437
	YCAM6	Buena	492,8	S 00 38.333 W 090 17.394	425
Cerro Mesa	YCM1	Buena	694,7	S 00 38.534 W 090 17.137	496
	YCM2	Buena	296,2	S 00 38.563 W 090 17.080	485
	YCM3	Buena	339,8	S 00 38.574 W 090 17.284	427
Cascajo	YCAS1	Buena	149,5	S 00 40.251 W 090 16.279	278
	YCAS2	Buena	439,7	S 00 40.270 W 090 16.183	285
	YCAS3	Buena	359,5	S 00 40.216 W 090 16.211	281
	YCAS4	Buena	217	S 00 40.226 W 090 16.263	283
	YCAS5	Buena	432,6	S 00 40.301 W 090 16.263	281
	YCAS6	Buena	233,5	S 00 40.347 W 090 16.237	267
	YCAS7	Buena	519,1	S 00 40.228 W 090 16.284	288
Garrapatero	YGAP1	Buena	304,6	S 00 40.397 W 090 14.335	132
	YGAP2	Buena	262,9	S 00 40.617 W 090 14.053	94
	YGAP3	Buena	215,9	S 00 40.367 W 090 14.460	138
	YGAP4	Buena	231	S 00 40.398 W 090 14.537	139
	YGAP5	Buena	552,9	S 00 40.394 W 090 14.602	148
	YGAP6	Buena	392,7	S 00 40.360 W 090 14.667	142
Bellavista	YBE1	Buena	542,9	S 00 41.634 W 090 19.280	202
	YBE2	Buena	407,1	S 00 41.594 W 090 19.216	219
	YBE3	Buena	541,7	S 00 41.688 W 090 19.162	210
	YBE4	Buena	144	S 00 41.558 W 090 19.037	220
	YBE5	Buena	245,4	S 00 41.407 W 090 18.974	231
	YBE6	Buena	200,4	S 00 41.564 W 090 18.817	216

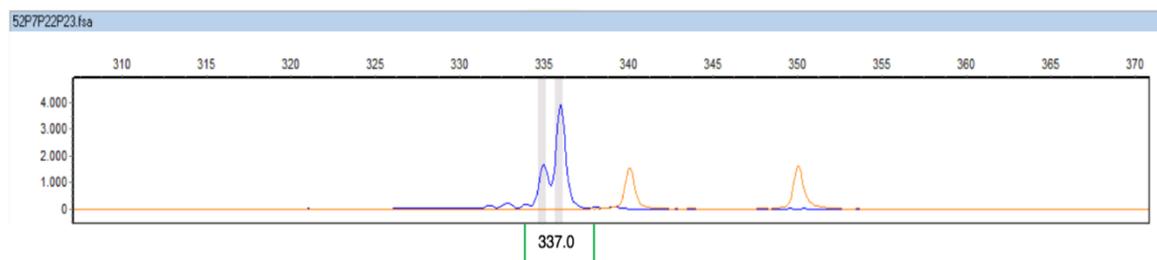
Tomás de Berlanga	YTB1	Buena	551,1	S 00 42.394 W 090 19.304	139
	YTB2	Buena	526,8	S 00 42.387 W 090 19.234	147
	YTB3	Buena	592,1	S 00 42.433 W 090 19.324	142
	YTB4	Buena	470,4	S 00 42.559 W 090 19.218	137
	YTB5	Buena	978,3	S 00 42.525 W 090 19.100	134
	YTB6	Buena	956,5	S 00 42.470 W 090 18.986	141
	YTB7	Buena	887,6	S 00 42.430 W 090 19.324	144
Parque Artesanal	YPA1	Buena	157,1	S 00 42.540 W 090 20.196	156
	YPA2	Buena	208,7	S 00 42.598 W 090 20.217	152
	YPA3	Buena	490,8	S 00 42.686 W 090 20.201	141
	YPA4	Buena	473,4	S 00 42.797 W 090 20.227	141
	YPA5	Buena	1007,6	S 00 42.706 W 090 20.266	145
	YPA6	Buena	462,2	S 00 42.589 W 090 20.251	154
	YPA7	Buena	312,4	S 00 42.477 W 090 20.246	161
Los Guayabillos	YGUA1	Buena	490,4	S 00 41.910 W 090 20.484	179
	YGUA2	Buena	585,3	S 00 41.891 W 090 20.436	182
	YGUA3	Buena	376,3	S 00 42.053 W 090 20.498	178
	YGUA4	Buena	361,8	S 00 42.174 W 090 20.596	166
	YGUA5	Buena	243,1	S 00 42.286 W 090 20.620	165
	YGUA6	Buena	345,6	S 00 42.410 W 090 20.660	160
Occidente	YOCC1	Buena	134,5	S 00 42.526 W 090 21.422	140
	YOCC2	Buena	638,1	S 00 42.461 W 090 20.925	153
	YOCC3	Buena	501,8	S 00 42.465 W 090 21.038	154
	YOCC4	Buena	189,5	S 00 42.471 W 090 21.111	155
	YOCC5	Buena	693,7	S 00 42.485 W 090 21.366	148
	YOCC6	Buena	455,1	S 00 42.421 W 090 21.403	154
Manzanillo	YMAN1	Buena	324,3	S 00 41.759 W 090 24.102	174
	YMAN2	Buena	610,3	S 00 41.780 W 090 24.045	176
	YMAN3	Buena	345,3	S 00 41.855 W 090 24.065	177
	YMAN4	Buena	485,5	S 00 41.907 W 090 24.118	171
	YMAN5	Buena	245,7	S 00 41.915 W 090 24.199	166
	YMAN6	Buena	400,9	S 00 41.807 W 090 24.165	175
Pájaro Brujo	YPB1	Buena	381,2	S 00 39.461 W 090 24.534	388
Elias Cando	YEC1	Buena	414,8	S 00 40.631 W 090 20.401	358
	YEC2	Buena	495,5	S 00 40.507 W 090 20.390	385
Chato	YCH1	Buena	319,3	S 00 39.979 W 090 26.363	218
	YCH2	Buena	329,5	S 00 40.118 W 090 26.341	206
	YCH3	Buena	295,9	S 00 40.118 W 090 26.341	206
	YCH4	Buena	397,3	S 00 40.336 W 090 26.280	207
	YCH5	Buena	378,6	S 00 40.295 W 090 26.237	206
	YCH6	Buena	422,3	S 00 40.219 W 090 26.126	228
Caseta	YKZ1	Buena	413,5	S 00 41.227 W 090 24.810	199



**Anexo 3.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% para visualizar la amplificación de los loci microsatélites mediante el uso del sistema de tres primers a partir de las muestras de ADN de *P.galapageium* de distintas localidades de la Isla Santa Cruz. **a)** Amplificación con el primer GYB7 con muestras de Pájaro Brujo (YPB), Elias Cando (YEC), Chato (YCH), Caseta (YKZ), Bellavista (YBE), Cerro Mesa (YCM), Cascajo (YCAS), Garrapatero (YGAP) y Los Guayabillos (YGUA). **b)** Amplificación con el primer GYB29 con muestras de Manzanillo (YMAN), Granillo Rojo (YGR), Parque Artesanal (YPA), Los Gemelos (YGE), Cascajo (YCAS), Tomás de Berlanga (YTB), Cerro Mesa (YCM) y Bellavista (YBE). Ladder 100pb (Invitrogen) y Control Negativo.



a)



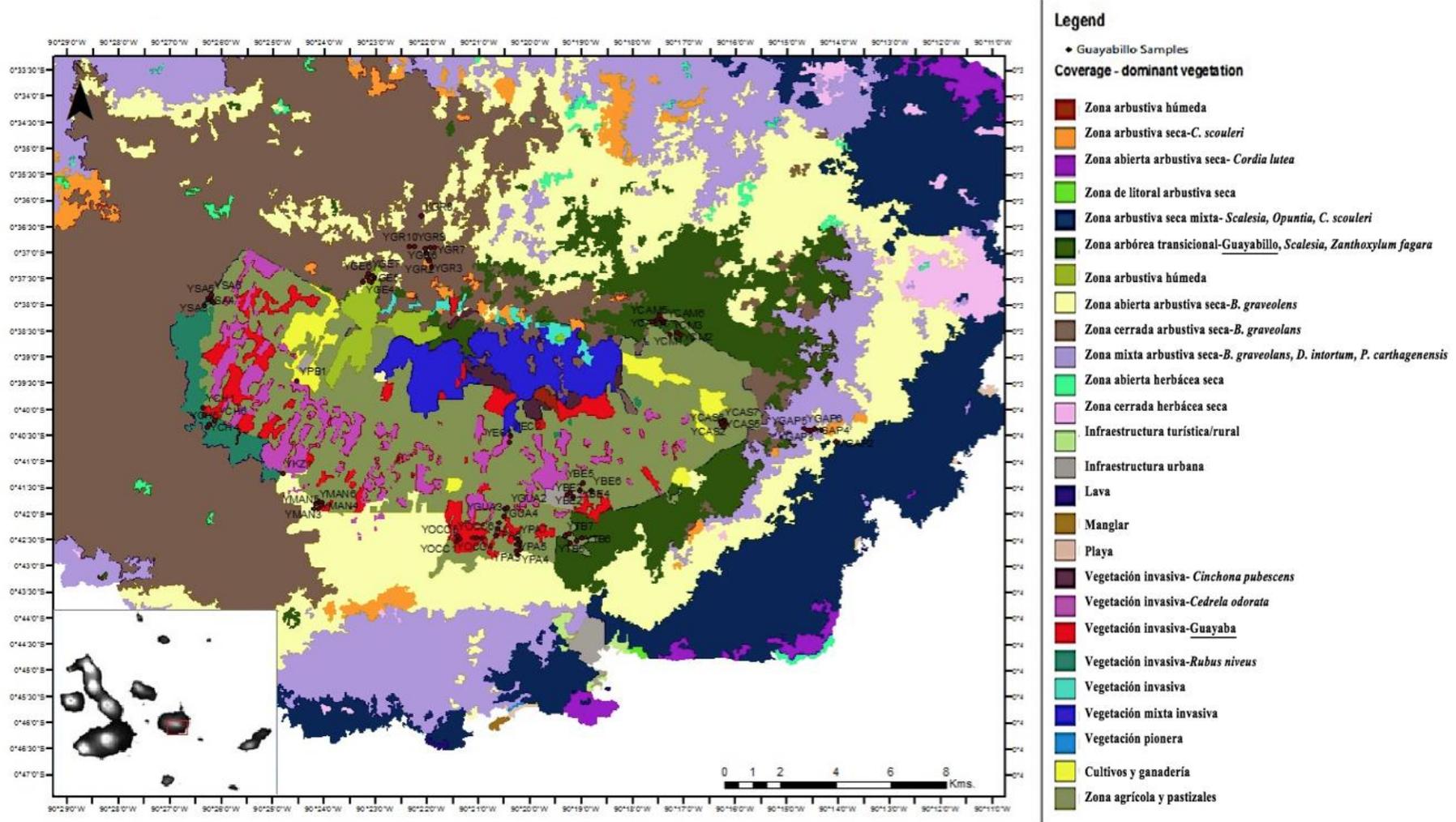
b)

**Anexo 4.** Picos de fluorescencia generados después de la electroforesis capilar analizados en software GeneMarker. **a)** Individuo YGUA2 amplificado con el primer GYB27 y fluoróforo NED, se muestran dos alelos (heterocigoto) con tamaños de 325 y 331 pb. **b)** Individuo YGAP3 amplificado con el primer GYB23 y fluoróforo 6FAM, se muestra un alelo (homocigoto) con tamaño de 337 pb.

**Anexo 5.** 30 marcadores microsatélites diseñados con la cola A agregada (GCCTCCCTCGCGCCA) de los cuales se seleccionaron 15 primers para realizar el presente estudio marcados en amarillo. Se muestran las secuencias forward y reverse de cada uno, el número de motivos y la temperatura de *annealing* estandarizada.

Primers	Forward Primer	Reverse Primer	Motifs(bases)	T° annealing
<b>GYB1</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGTTAGGGTCGAAACAGTCCTAAACC	GTGATGGTCAACAGAGGGAAATAGG	AAAAAT(60)	NE
<b>GYB2</b>	GCCTCCCTCGCGCCATTTGTCACCCTACATAATTCTTCCC	GGAGAGAGCGAGACAAGCATAGG	AAAGAG(54)	NE
<b>GYB3</b>	GCCTCCCTCGCGCCAAAAAGTCAAATAAAAGCCGCCTACG	AGGTTACTCTAATGCCCTTTCGG	AAAT(32)	60°C
<b>GYB4</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGTAGGCTTTGAAAATTCTCATCCG	CTTATGGAGGCAAATTCGATCAGG	TTC(27)	65°C
<b>GYB5</b>	GCCTCCCTCGCGCCACACAAGTATCGTGCTACCAAATCG	GCCGGATATGCAAATATATGATCG	TTC(27)	63°C
<b>GYB6</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGCTACCTAAGTGTGAAAAGAGAACG	GGAAACCACTCGTGAGTATTACAGC	ATT(30)	64°C
<b>GYB7</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGCAGGCAAGAACAGATAGAGATCG	TCTTCTCAACAACCAGATTCTCACC	TCC(33)	64°C
<b>GYB8</b>	GCCTCCCTCGCGCCAATGGCCGGAAGAATCAAATCC	CATCTCTCATCTTGTCCACATCC	ATT(39)	67°C
<b>GYB9</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGCTCTGTTAATCTGGGCTTTGC	CTCCTTCAAAAATTCACACTGACC	TTC(30)	67°C
<b>GYB10</b>	GCCTCCCTCGCGCCAATGAGAGAAGTCAAAGCAAGGAACG	ATTCGCTCCCAAACTAATACACACG	ATT(39)	NE
<b>GYB11</b>	GCCTCCCTCGCGCCAAGTGAGAGTGGGTAAGATCAGTGC	GTGAGAAATTGGGGACTATATGGG	TTC(36)	68°C

<b>GYB12</b>	GCCTCCCTCGCGCCAACCTATTGCTGCGACGTTCTTCC	ATGTATGCACCCTCTTGTTTTAACG	TTC(42)	68°C
<b>GYB13</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGATCAACCTGATCCTTGAAGTGG	TTATCGGTTAGTGCGTCTGAAAACC	ATT(27)	NE
<b>GYB14</b>	GCCTCCCTCGCGCCAATCCACTTTCATATCATGCAAGACC	TGCACAAATGTATCCTCTTAAGTGC	ATT(36)	66°C
<b>GYB15</b>	GCCTCCCTCGCGCCATAAGCCTGGCCTTACTAAAAATCACC	TATGACTTCGGAGGGACTGTGC	AAC(27)	64°C
<b>GYB16</b>	GCCTCCCTCGCGCCACCTGGTGCAGTACTTTCATTTATAAGC	CAATCATCAATTTTCGCTCTTACCC	TTC(33)	NE
<b>GYB17</b>	GCCTCCCTCGCGCCAAGTGAGTTCGTCAAGGCAAGG	GAAATTATTGACATGGACCTAACCG	ATT(36)	NE
<b>GYB18</b>	GCCTCCCTCGCGCCAACCTGAGTTTCGATCGAGTCTATGGG	AGAGCCCTAAGGACTTAGAGAATGC	ATT(30)	60°C
<b>GYB19</b>	GCCTCCCTCGCGCCAACCTGCTCAGCTCGTCTTACC	TTAACAGAGGAGTTGAAGGCAAAGG	TGC(27)	NE
<b>GYB20</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGAGGAAGCGATAGTGTATGTTGAGC	CACAAAGTCCCTTTGCTTTTGC	ATC(33)	63°C
<b>GYB21</b>	GCCTCCCTCGCGCCACCGATTCTGGTAAGGAGAGAGG	TGTTGTAGTTTGTAGGTCCATGTCG	TTC(33)	57°C
<b>GYB22</b>	GCCTCCCTCGCGCCAATGAAGATCAACCTCTTCCATTGC	AGTAATGACTCCGGTCAGTCTTCC	TTC(27)	60°C
<b>GYB23</b>	GCCTCCCTCGCGCCACTTAAATTTTCGCTCTCTCTTTCG	ACAAATCCACGGTAATTGTATGAGC	ATT(30)	64°C
<b>GYB24</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGTGTTCAGAGACATTCTATCGTTGC	ATTCTAGAGCCGTGACTTGTCTCG	TGC(30)	NE
<b>GYB25</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGCCAGCAAATCAAAATTATCCC	GGACCGATCAAATCTTCTAAACC	ATC(27)	63°C
<b>GYB26</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGGGGAATGAGCAAGAGAAAAGG	GTCATTCGTGGTAGAAGTTATTCGG	TTC(27)	68°C
<b>GYB27</b>	GCCTCCCTCGCGCCATCTTGATGAACCAAGACCTACTGC	CCAAACACAAGATAACGAACTTTCC	ATT(36)	67°C
<b>GYB28</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGACCAGTGAATAAAAGAGTTTGTGC	TTGTTGAAGTGAAAGAGAGAAAACG	ATC(36)	NE
<b>GYB29</b>	GCCTCCCTCGCGCCATTTGTCTGGGACTCTCTAATGGC	GAGGTTACGTAGAATTCTTGATGTGC	TTC(27)	65°C
<b>GYB30</b>	GCCTCCCTCGCGCCAGGTCAAGCAAAGAGAGAAATGC	TTTCTTGCTTTTCGTGATTCCG	TGC(27)	63°C



Anexo 6. Mapa de recolección de muestras 93 de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz y las zonas de vegetación. Mapa realizado por Diego Urquía.

