

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio Preliminar de Diversidad Genética de *Ilex guayusa* en la Amazonía ecuatoriana
mediante marcadores moleculares ISSR**

JUAN DANIEL MOSQUERA BOLAÑOS

María de Lourdes Torres, PhD, Directora de Tesis

**Tesis Presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en Procesos
Biotecnológicos**

Quito, mayo de 2015

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS

**Estudio Preliminar de Diversidad Genética de *Ilex guayusa* en la Amazonía ecuatoriana
mediante marcadores moleculares ISSRs**

Juan Daniel Mosquera Bolaños

María de Lourdes Torres, Ph.D.,

Directora de tesis y

Miembro de Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.,

Miembro del Comité de Tesis

Andrés Torres, Ph.D.,

Miembro del Comité de Tesis

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: Juan Daniel Mosquera Bolaños

C. I.: 1720624251

Lugar y fecha: Quito, mayo de 2015

Dedicatoria

Este trabajo lo dedico a mi madre. Tu apoyo y cariño fueron incondicionales. Supiste entenderme mejor que nadie. Los frutos de todos mis esfuerzos son, y serán siempre, dedicados a ti. A mi mis amigos Andrés, Alex, Carlos, Nicolás y Luis. Han estado conmigo en mis mejores y peores momentos. Y al amor de mi vida, Xavi. Eres la fuente de mi felicidad.

Me tendrán siempre para ustedes y los quiero conmigo para el resto de mi vida.

Agradecimientos

Lo conseguido con este trabajo ha sido con un esfuerzo conjunto. Agradezco a mis familiares más cercanos, mis padres Juan y Elvia, mi hermano Paúl, y mi abuela Hilda; quienes siempre supieron apoyarme en todos los aspectos de mi vida, cada uno a su manera. Nada de esto hubiera sido posible sin ustedes. Madre, tú supiste ser la mejor para alguien como yo, vives en mi mente y en cada aspecto de mi vida.

A mis amigos, Andrés, Darío, Alexander, Carlos, Nicolás, Luis, Joely, Estefis. Vivi, es imposible no agradecerte, eres una persona única, te admiro mucho. Ustedes me han dado los mejores momentos de mi vida, me han abierto los ojos a muchas cosas; y sobre todo, me han aceptado tal y como soy.

A mis profesores, Lourdes, Sonia y Venancio, quienes me dieron las herramientas necesarias para llegar a donde estoy y supieron trascender en mi vida con su interés y aliento genuinos. Sonis, mi cariño por usted es inmenso, su ayuda y comprensión son invaluable.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ y todos lo que lo conforman. Ha sido como un segundo hogar. No cambiaría lo vivido por nada.

A Xavi, mi amor. Siempre has sido, y serás, mi más grande inspiración. Eres la luz de mi vida. Gracias por existir.

Resumen

Ilex guayusa es una planta que se encuentra en la Amazonía ecuatoriana. A pesar de ser ampliamente utilizada de manera tradicional por varios grupos indígenas, la información sobre su historia, distribución y cultivo es muy limitada. En este estudio se analizó la diversidad genética de guayusa en diferentes localidades de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Se utilizaron 12 primers ISSRs en 157 individuos de guayusa, de los cuales 9 amplificaron regiones entre microsatélites en 100% de las muestras dando un total de 106 bandas (85.85% polimórficas), con un promedio de 11.77 bandas por primer. Se obtuvo una variabilidad dentro y entre poblaciones de 82% y 18% respectivamente. Las distancias genéticas de Nei indican una diversidad genética reducida, siendo mayor la distancia entre la población de Napo y Zamora Chinchipe (0.086) y la menor entre la población de Napo y Orellana (0.013). El análisis de con STRUCTURE (K=2), sugiere dos posibles líneas ancestrales, la primera comprende los individuos de la población de Sucumbíos y parte de los individuos de la población de Napo; y la segunda el resto de individuos de Napo y de las poblaciones de las provincias de Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. La agrupación obtenida con STRUCTURE se ve apoyada por el dendrograma (Neighbor Joining) y análisis de clusters (PCoA) basados en las distancias genéticas. Este es el primer estudio de diversidad genética en *Ilex guayusa* por lo que es necesario extender el análisis a un mayor número de poblaciones en estudios futuros, con el fin de comprender de mejor manera la estructura poblacional y diversidad genética de la guayusa en el Ecuador. El obtener esta información contribuye a evaluar el estado de conservación de la guayusa y a llevar a cabo planes de manejo adecuado como el establecimiento de sistemas agroforestales que permitan conservar la diversidad genética de esta especie.

Abstract

Ilex guayusa is a plant found in the Ecuadorian Amazon. Although broadly used traditionally by various indigenous groups, the information about its history, distribution and culture is very limited. In this study, the genetic diversity of guayusa from different locations of the Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago and Zamora Chinchipe provinces was determined. Twelve ISSRs primers were used on a total of 157 guayusa individuals, from which 9 amplified in 100% of the samples, giving a total of 106 bands (85.85% polymorphic) , with an average of 11.77 bands per primer. The variability between and within populations was 82% and 18% respectively. Nei genetic distances indicated a reduced genetic diversity between populations, being the distance between Napo and Zamora Chinchipe (0.0086) the greatest, and the distance between Napo and Orellana (0.013) the lowest. The population structure analysis STRUCTURE (K=2), suggested two possible ancestral lines. The first ancestral line comprised the individuals from the population of Sucumbios and some individuals from the population of Napo. The second ancestral line comprised the remaining individuals of the population of Napo and the populations of Orellana, Pastaza, Morona Santiago and Zamora Chinchipe. The groups obtained with STRUCUTRE were supported by the Neighbor Joining (dendrogram) and cluster analysis (PCoA) inferred from genetic distances. This present study is the very first involving *Ilex guayusa*, making it necessary to assess a greater number of individuals from various populations with the aim of having a broader understanding of the population structure and genetic diversity of guayusa in Ecuador. Obtaining this information contributes to evaluate guayusa's conservation status and also to develop adequate management plans such as the establishment of agroforestry systems allowing the conservation of the genetic variability of this species.

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. Introducción..... | 14 |
| 1.1. Género <i>Ilex</i> | 14 |
| 1.2. <i>Ilex guayusa</i> | 15 |
| 1.3. Diversidad genética..... | 16 |
| 1.4. Marcadores moleculares | 17 |
| 1.5. ISSRs | 18 |
| 2. Objetivos | 20 |
| 2.1. General..... | 20 |
| 2.2. Específicos | 20 |
| 3. Área de estudio | 21 |
| 4. Justificación | 22 |
| 5. Materiales..... | 24 |
| 5.1. Material vegetal | 24 |
| 5.2. Extracción de ADN..... | 24 |
| 5.3. Cuantificación de ADN | 24 |
| 5.4. Amplificación de marcadores ISSRs | 25 |
| 5.5. Electroforesis en geles de agarosa | 25 |
| 6. Métodos | 27 |
| 6.1. Obtención de Material Vegetal y Datos Pasaporte | 27 |
| 6.2. Extracción y Cuantificación de ADN | 27 |
| 6.3. Selección y Evaluación de Primers..... | 28 |
| 6.4. Amplificación de regiones ISSR por PCR..... | 29 |
| 6.6. Toma de datos y Análisis Estadístico | 30 |
| 7. Resultados | 31 |
| 7.1. Extracción y cuantificación de ADN | 31 |
| 7.2. Amplificación de regiones ISSRs por PCR | 31 |
| 7.3. Índices de diversidad | 31 |
| 7.4. Análisis de PCoA y Clusters..... | 32 |

| | |
|---|-----------|
| 7.5. Estructura poblacional mediante modelo Bayesiano | 33 |
| 8. Discusión | 34 |
| 9. Conclusiones | 41 |
| 10. Recomendaciones | 42 |
| 11. Bibliografía | 43 |
| 12. Tablas | 47 |
| 13. Figuras..... | 49 |
| 14. Anexos | 54 |

Lista de Tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1: Número y procedencia de individuos de guayusa colectados. | 47 |
| Tabla 2: Información de los 9 primers utilizados en el estudio de <i>Ilex guayusa</i> mediante ISSRs | 47 |
| Tabla 3: Matriz de distancia genética de Nei de las poblaciones de <i>Ilex guayusa</i> comparadas por pares. | 47 |
| Tabla 4: Heterocigosidad calculada de cada provincia y valores totales..... | 48 |

Lista de Figuras

- Figura 1:** Mapa de la ubicación de las 157 muestras de guayusa recolectadas.....51
- Figura 2:** Amplificación con el primer 825 de las muestras 81 a 122 de guayusa. L es el ladder 100 bps de Axygen. En el individuo 109 se puede observar la ausencia de una banda entre 1500 y 1000 bps.....50
- Figura 3:** Plano de dos dimensiones de las dos primeras coordenadas del PCoA mostrando la asociación de los 157 individuos de guayusa analizados con 9 primers ISSRs. Los colores representan la provincia de origen de cada individuo: verde Sucumbíos, negro Napo, naranja Orellana, azul Pastaza, rojo Morona Santiago y púrpura Zamora Chinchipe51
- Figura 4:** Dendrograma de 157 muestras de *Ilex guayusa*, derivado del análisis Neighbor Joining con los 9 primers ISSRs. Los números en las ramificaciones son valores de bootstrap obtenidos con 500 re-muestreos. Los colores representan la provincia de origen de cada individuo: Verde Sucumbíos, negro Napo, naranja Orellana, azul Pastaza, rojo Morona Santiago y púrpura Zamora Chinchipe.....52
- Figura 5:** Grafico de asignación de coeficiente ancestral de los individuos investigados para un modelo poblacional $K=2$. Los subgrupos identificados por STRUCTURE se encuentran indicados en color rojo y verde.....53

Lista de anexos

| | |
|--|----|
| Anexo 1A: Información de origen de las muestras recolectadas de <i>Ilex guayusa</i> en la Amazonía ecuatoriana. | 54 |
|--|----|

1. Introducción

1.1. Género *Ilex*

Ilex es uno de los dos géneros que conforman la familia Aquifoliaceae y comprende alrededor de 600 especies que poseen una notable diversidad morfológica; incluyendo arbustos; árboles perennifolios y árboles deciduos de gran importancia económica (Cuénoud *et al.*, 2000). Las plantas del género *Ilex* son de funcionalidad decidua; sus flores masculinas poseen pistilos rudimentarios y sus flores femeninas estambres estériles. El polen de *Ilex* es muy característico por lo que se ha podido rastrear remanentes fósiles de este género que datan de hace aproximadamente 90 millones de años (edad Turoniana); y se ha establecido que este género era ya cosmopolita durante el Cretáceo. En la actualidad, las especies de *Ilex* se encuentran distribuidas en su mayoría en América, Asia y Europa. Junto con el Este de Asia, Sudamérica es considerada una de las áreas principales de diversificación de *Ilex*; encontrándose el mayor número de especies en zonas tropicales y subtropicales (Gottlieb *et al.*, 2005).

Varias especies de *Ilex* son utilizadas a nivel mundial por grupos étnicos con el fin de elaborar bebidas con propiedades medicinales para su consumo diario. De estas plantas se han aislado compuestos como polifenoles, flavonoides, saponinas y glucósidos que poseen actividades antiinflamatorias, antimicrobianas, antiparasitarias y antioxidantes. Estas características convierten al género *Ilex* en una fuente botánica de compuestos activos con potencial uso farmacéutico (Hao *et al.*, 2013).

En Sudamérica se prepara bebidas populares con un profundo trasfondo cultural, a partir de tres especies de *Ilex*: la yerba mate, elaborada a partir de las partes aéreas de *Ilex*

paraguariensis St-Hil; el té, a partir de *Ilex tarapotina*; y la guayusa, a partir de las hojas de *Ilex guayusa*. Todas estas bebidas contienen diferentes cantidades alcaloides como metilxantinas, cafeína y teobrominas (Crown, 2012).

1.2. *Ilex guayusa*

La guayusa es un árbol perenne que puede llegar a medir 20 metros de altura. Su tronco es de corteza blanca de textura lisa y sus hojas son coriáceas dentadas. *Ilex guayusa* es una planta dioica, su flor posee una corola de color blanco; el número de estambres es igual al de los pétalos y su fruto es una baya verde en forma de globo de aproximadamente un centímetro de ancho (Caranqui *et al.*, 2012).

En la Amazonía ecuatoriana, *Ilex guayusa* es la planta más utilizada y cosechada por grupos étnicos como los Kichwas (Innerhofer *et al.*, 2011). Los Kichwas utilizan las hojas de la guayusa para preparar una bebida matutina, rica en cafeína, con el propósito de proporcionarles buena suerte en la caza y pesca, y también para la protección contra mordidas de serpientes (Crown, 2012; Bennett, 1992; Innerhofer *et al.*, 2011). Los Jívaros y Achuar también beben grandes cantidades de té de guayusa, para luego vomitarlo; con lo cual se reduce el ingreso excesivo de cafeína evitando trastornos del sistema nervioso central. Este ritual es realizado a diario, antes de empezar el día (Lewis *et al.*, 1991). Las hojas de la guayusa también pueden ser consumidas en forma de té en casos de gastritis, como relajante y para aumentar la fertilidad en mujeres (Tene, *et al.* 2007).

1.3. Diversidad genética

La guayusa es comercializada como té en el Ecuador, pero se conoce poco sobre su historia, distribución y cultivo. Es por esto que estudios de diversidad genética podrían ayudar a entender cuál es el estado de conservación de ésta especie y de sus poblaciones en los sitios en donde se la cultiva y, a partir de esta información, plantear programas de manejo y conservación.

La diversidad genética es una de las medidas para evaluar la conservación de una especie, es decir qué tan propensa es a volverse extinta o permanecer en el tiempo (Reed *et al.*, 2003). Esto es debido a que la diversidad genética es requerida para que una población evolucione en respuesta a cambios ambientales. La diversidad genética se ve reflejada en los niveles de heterocigosidad de una especie y la heterocigosidad, a su vez, está correlacionada con la capacidad de un genotipo de persistir y ser transmitido a las siguientes generaciones; es decir su eficacia biológica. Niveles bajos de heterocigosidad están relacionados directamente con la reducción de la eficacia biológica de la población (Reed *et al.*, 2003; Lacy, 1987).

La disminución de la heterocigosidad de los individuos de una población puede llevar a efectos deletéreos como una menor variabilidad y fecundidad, producto de la pérdida de alelos (Reed *et al.*, 2003; Lacy, 1987). Con la pérdida de estos alelos viene la pérdida de la flexibilidad evolutiva conferida por la diversidad genética. La falta de variabilidad entre individuos, a partir de la cual la selección natural pueda actuar, hace que las poblaciones se vuelvan vulnerables a nuevos predadores, enfermedades, parásitos, condiciones climáticas y competidores (Lacy, 1987). Los estudios moleculares de diversidad genética pueden ser utilizados para evaluar la eficacia biológica de una población y tomar decisiones con respecto

a su conservación. La variabilidad genética provee estimados sobre la habilidad de una población para responder a presiones selectivas producto de un ambiente cambiante (Reed *et al.*, 2003).

Las prácticas agrícolas actuales pueden dar paso a una pérdida de diversidad genética conocida como erosión genética (Esquinas-Alcázar, 2005). En varios cultivos se da prioridad a la producción basada en uniformidad, en lugar de una producción más diversificada. Diferentes variedades de un mismo cultivo pueden tener características genéticas favorables que pueden conferir ventajas para la supervivencia y que se pierden al solo enfocarse en cultivos homogéneos (Esquinas-Alcázar, 2005). La reducción en el pool genético que está disponible para la selección natural, y para la selección por parte de agricultores y generadores de nuevas variedades, incrementa la vulnerabilidad de los cultivos a cambios ambientales repentinos. Por otro lado, la diversidad genética y la funcionalidad de los ecosistemas también están relacionadas. La diversidad genética resulta de gran importancia para la dinámica de recursos y estabilidad del ecosistema ya que incrementa las interacciones beneficiosas y funciones complementarias. Las poblaciones deben mantener su diversidad genética para minimizar el riesgo de extinción (Reed *et al.*, 2003; Lacy, 1987).

1.4. Marcadores moleculares

Una de las herramientas para evaluar la diversidad genética de una población son los marcadores moleculares, los cuales generan un perfil específico de ADN para un individuo (Bornet *et al.*, 2001). Un marcador molecular es cualquier fragmento de ADN polimórfico que indica una determinada posición en un genoma, y que tiene una expresión identificable (Cubero, 2002). En la actualidad existen varios tipos de marcadores moleculares. Las

isoenzimas han sido utilizadas para caracterizar la diversidad genética de especies de plantas pero suelen no tener un poder de discriminación suficiente para realizar una distinción entre individuos. Las técnicas de ADN basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como los microsatélites, amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), repetición de secuencia interna simple (ISSR) y polimorfismos en longitud de segmento amplificados (AFLP) son las más empleadas. Esto se debe a que estos marcadores proveen un mayor número de loci potencialmente polimórficos. Además, requieren de una cantidad reducida de tejido siendo técnicas que conservan la integridad de los organismos que se encuentren en estudio. (Escudero *et al.*, 2003).

1.5. ISSRs

Los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) son marcadores moleculares dominantes que permiten evaluar la variación entre las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en el genoma. Los microsatélites son secuencias simples repetidas en tándem (constan de motivos que pueden ser penta, tetra, tri o dinucleótidos) y se encuentran entre secuencias no repetidas del genoma. Los ISSRs son amplificados por PCR mediante un primer de secuencia complementaria a un microsatélite. El momento en el que dos microsatélites con orientación invertida se encuentran a una distancia amplificable, el primer complementario a ellos puede dar paso a la amplificación del segmento de ADN intermedio. De esta manera se genera un patrón para cada individuo analizado en base al polimorfismo detectado con la ausencia o presencia de los productos de amplificación (Zietkiewicz *et al.*, 1994).

Los marcadores moleculares ISSR son una herramienta empleada en varias áreas de estudio de plantas. Son utilizados para inferir las relaciones filogenéticas dentro de especies y

ente especies cercanas utilizando análisis tanto de distancia como de parsimonia. También pueden ser utilizados para el mapeo genómico, biología de la evolución y diversidad genética (Pradeep *et al.*, 2002; Zietkiewicz *et al.*, 1994). Debido a que la tasa de mutación dentro de los microsatélites es considerablemente más alta que en la mayoría de otros tipos de ADN, la probabilidad de encontrar polimorfismos en estas secuencias es mucho mayor (Pradeep, *et al.* 2002; Zietkiewicz, *et al.* 1994). La fuente de variabilidad en los ISSRs puede ser atribuida a varias razones. Las mutaciones en el lugar de unión de los primers, al igual que inserciones o deleciones en la región SSR o en la región entre SSRs, son eventos que pueden generar polimorfismos de presencia o ausencia de amplificación. Los polimorfismos encontrados también varían con la naturaleza del primer, dependiendo de si es anclado, es decir que posee nucleótidos adicionales en el extremo 3' o 5', o no anclado, es decir simplemente la secuencia del motivo repetido complementario al microsatélite (Pradeep *et al.*, 2002).

En este proyecto se evaluó la diversidad genética de 157 individuos pertenecientes a *Ilex guayusa* distribuidos en las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe de la Amazonía ecuatoriana utilizando 9 primers marcadores ISSR. Esto permitió conocer la distribución, diversidad genética y estructura poblacional de un cultivo no convencional y con mucho potencial económico en nuestro país con el fin de tener una base para estudios posteriores que ayuden al manejo óptimo de guayusa.

2. Objetivos

2.1. General

- Determinar la diversidad genética de 157 individuos de *Ilex guayusa* de las seis provincias de la Amazonía ecuatoriana mediante el uso de marcadores ISSRs.

2.2. Específicos

- Estandarizar un protocolo para la extracción de ADN para guayusa.
- Estandarizar un protocolo para la amplificación de marcadores moleculares ISSR, mediante PCR, para muestras de ADN de guayusa.
- Establecer el nivel de diversidad genética y estructura poblacional a partir de los polimorfismos encontrados en 157 individuos de *Ilex guayusa* de las seis provincias de la Amazonía ecuatoriana usando 9 primers marcadores ISSRs.

3. Área de estudio

El material biológico que se utilizó en este estudio fueron hojas jóvenes de 157 individuos de guayusa que se colectaron en Sucumbíos (1 localidad), Napo (38 localidades), Orellana (3 localidades), Pastaza (18 localidades), Morona Santiago (3 localidades) y Zamora Chinchipe (2 localidades). Cada muestra consistió de alrededor de 5 hojas jóvenes provenientes de las partes más bajas de los árboles que estaban al alcance. En los sitios de colección se obtuvieron los datos de altitud en metros sobre el nivel del mar y la posición referenciada por un GPS (Anexos 1 y 2). La recolección del material fue basada en su mayoría en la lista de proveedores de hojas de guayusa de la fundación RUNA, quienes también colaboraron en el muestreo y obtención de datos pasaporte.

La extracción, cuantificación y dilución y amplificación de ADN, al igual que la electroforesis en geles de agarosa y el análisis estadístico fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

4. Justificación

La diversidad genética representa la variación heredable dentro y entre poblaciones de organismos. Como resultado de la diversidad genética se tiene una infinidad de recursos biológicos, como la guayusa que proveniente de los bosques tropicales de la Amazonía ecuatoriana. Runa es una fundación que busca el beneficiar a las comunidades de la Amazonía ecuatoriana a partir del comercio justo de la guayusa, dándole un valor agregado y generando beneficio local. Es por esto que busca llegar a su manejo óptimo. Lo cual involucra el conocer el estado de conservación de la guayusa, no solo con el fin de evitar su pérdida como especie, sino también, con el objetivo de conservar y utilizar la mayor cantidad de diversidad posible. La descripción de la extensión y la distribución de los diferentes aspectos de la diversidad genética de una especie, y la manera en la cual está estructurada, son un prerequisite esencial para determinar que se debe conservar, dónde y cómo.

La variabilidad genética es una medida de conservación de una especie ya que es la base para la evolución como respuesta a eventos como cambios ambientales, plagas, enfermedades y depredadores. También hace posible el generar nuevas variedades de cultivos, ya sea a través del cruzamiento clásico o de técnicas biotecnológicas. En la actualidad las prácticas agrícolas se han centrado en la producción de cultivos homogéneos adaptados únicamente a la demanda, dejando de lado el potencial de la diversidad genética, cuya protección no solo viene a ser un reto técnico o científico, ya que en ella también están involucrados su manejo, uso e intercambio, al igual que los ámbitos socioeconómico, legal, político y ético (Esquinas-Alcázar, 2005).

Por lo tanto, este proyecto busca aportar al entendimiento de la diversidad genética y estructura poblacional de *Ilex guayusa* en la Amazonía ecuatoriana como base para su manejo sostenible enfocado en su conservación.

5. Materiales

5.1. Material vegetal

- Hojas de 157 individuos de guayusa recolectados en diferentes localidades de 7 provincias de la Amazonía ecuatoriana (Anexo 1).
 - Sucumbíos – 1 individuo, 1 localidad
 - Napo – 89 individuos, 38 localidades
 - Orellana – 7 individuos, 3 localidades
 - Pastaza – 37 individuos, 18 localidades
 - Morona Santiago - 11 individuos, 3 localidades
 - Zamora Chinchipe - 12 individuos, 2 localidades

5.2. Extracción de ADN

- Muestras de hojas de guayusa
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- 2, β -mercaptoetanol (Sigma)

5.3. Cuantificación de ADN

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

5.4. Amplificación de marcadores ISSRs

- ADN de guayusa
- 9 primers ISSRs (Zhou, 2009)
- Taq ADN polimerasa 5U/μL (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTPs 10 mM (Invitrogen)
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

5.5. Electroforesis en geles de agarosa

- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR
- SeaKem® LE Agarose
- SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)

- TBE 1X (Tris – Ácido bórico – EDTA)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)

5.6. Programas estadísticos

- GenaAIEx 6.501 (Peakall *et al.*, 2012)
- STRUCTURE (Evanno *et al.*, 2005)
- DARwin 5.0.158 (Perrier, 2006)
- CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007)

6. Métodos

6.1. Obtención de Material Vegetal y Datos Pasaporte

El material vegetal que se utilizó en este estudio fueron hojas de 157 individuos de *Ilex guayusa* que se colectaron en Sucumbíos (1 localidad), Napo (38 localidades), Orellana (3 localidades), Pastaza (18 localidades), Morona Santiago (3 localidades) y Zamora Chinchipe (2 localidades) (Figura 1). La recolección del material fue basada principalmente en la localización de plantas que descritas en la lista de proveedores de hojas de guayusa de la fundación RUNA, quienes también colaboraron en el muestreo y obtención de datos pasaporte.

Cada muestra consistió de alrededor de 5 hojas jóvenes provenientes de las partes más bajas de los árboles o arbustos; tomando en cuenta que fuesen hojas sanas, es decir que no estuvieran infectadas con hongos (manchas en las hojas). En los sitios de colección se obtuvieron los datos de altitud en metros sobre el nivel del mar y la posición referenciada por un GPS (Anexo 1).

Las hojas fueron colocadas en fundas Ziploc® y transportadas en hieleras a 4°C hacia el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en donde fueron almacenadas en un congelador a -20°C.

6.2. Extracción y Cuantificación de ADN

A partir de las hojas colectadas, se realizó la extracción de ADN siguiendo el protocolo a base de CTAB (Saghai-Marooof, *et al.* 1984). Se colocó aproximadamente 100 mg de tejido vegetal en un mortero y se lo molió con nitrógeno líquido. El producto de la molienda fue

recogido en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Se agregó buffer CTAB y β -mercaptoetanol y se incubó las muestras a 62°C durante una hora. Se agregó una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó por 20 minutos a 13200 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se le agregó isopropanol frío. A continuación se sometió los tubos a una nueva centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%. Finalmente, se dejó secar el pellet y se lo resuspendió en 50 μ L de buffer tris-EDTA (TE).

La calidad de las muestras de ADN extraído fue evaluada cualitativamente mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.75 % teñidos con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen), y visualizada utilizando un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD).

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

6.3. Selección y Evaluación de Primers

Para seleccionar los primers se realizó una búsqueda bibliográfica de publicaciones relacionadas con estudios moleculares en el género *Ilex*. Se seleccionaron 12 provenientes de un estudio realizado por Zhou (2009) de diversidad genética mediante ISSRs en varias especies de *Ilex*.

Se estandarizó la amplificación de cada primer realizando un PCR de gradiente, empleando 5 muestras seleccionadas al azar de entre todos los individuos analizados en este estudio. Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa (1.75%) para determinar su funcionalidad y temperatura óptima de amplificación. Nueve de los 12 primers

amplificaron bandas polimórficas y claras, por lo cual fueron empleados para el análisis de las 157 muestras de guayusa colectadas.

6.4. Amplificación de regiones ISSR por PCR

Siguiendo el protocolo de Zhou (2009), se consiguió determinar las condiciones óptimas para la reacción de PCR con los 9 primers seleccionados. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20 μ l y contenían 2 μ l de ADN (20 ng/ μ l), 2 μ l de Buffer de PCR (10 X), 2 μ l de BSA (10 mg/ml), 0.8 μ l de $MgCl_2$ (50 mM), 0.8 μ l de primer (4 μ M), 0.4 μ l de dNTPs (400 μ M), y 0.4 μ l de Taq Polimerasa Platinum Invitrogen (5U/ μ l). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 4 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, annealing a 52°C por 50 segundos, y finalmente un período de extensión a 72 °C por 1 minuto. Para completar el ciclado se terminó con una temperatura de extensión de 72°C por 7 minutos.

6.5. Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de la amplificación de las regiones ISSRs fueron analizados en geles de agarosa al 1.75%, teñidos con SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen). La electroforesis se realizó por 2.5 horas a 80V, para asegurar la separación y tinción óptima de bandas. Los perfiles de bandas obtenidos fueron visualizados utilizando un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD).

6.6. Toma de datos y Análisis Estadístico

A partir del perfil de bandas que se obtuvo en los geles de agarosa para cada ISSR, se construyó una matriz binaria a base de presencia o ausencia de determinada banda (1, 0 respectivamente). A través del software estadístico Dissimilarity Analysis and Representation for Windows (DARwin 5.0.158) (Perrier, 2006), se realizó un dendrograma usando una matriz de similitud (simple matching) al igual que un análisis de coordenadas principales (PCoA) usando una matriz de disimilaridad, y el coeficiente DICE. Para la obtención de porcentajes de variación molecular (AMOVA), heterocigosidad esperada e índices de diversidad de Nei y Li se utilizó el software GenAlEx 6.501 (Peakall *et al.*, 2012; Nei y Li, 1979).

Finalmente, se utilizó el software STRUCTURE para investigar la estructura poblacional, a partir de valores de K entre 1 y 15 con 15 corridas independientes, con un máximo de 100000 pasos de burning y 100000 pasos de cálculos de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). (Rosenberg *et al.*, 2002). La determinación del valor K óptimo se realizó utilizando el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) y la alineación para determinar la estructura de la población más parsimónica se realizó utilizando el programa CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007).

7. Resultados

7.1. Extracción y cuantificación de ADN

Se logró estandarizar la extracción de ADN de guayusa. Se extrajo ADN de las muestras de 157 individuos de guayusa provenientes de las provincias de Sucumbíos, Napo, Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe (Tabla 1). El ADN que se obtuvo presentó una buena calidad y su concentración varió entre 50 ng/ μ L y 3000 ng/ μ L.

7.2. Amplificación de regiones ISSRs por PCR

De los 12 primers evaluados, reportados en el estudio de Zhou (2009), se consiguió amplificación clara para 9 primers (Tabla 2). El resultado de la amplificación de regiones ISSR fue un patrón de bandas para cada uno de los 157 individuos, a partir del cual se detectaron polimorfismos (Figura 2). Se obtuvo un total de 106 bandas, con un promedio de 11.77 bandas por primer. De las 106 bandas, 91 (85.85%) fueron polimórficas. Con el primer 826 se obtuvo el mayor porcentaje de polimorfismo (100%), y con el primer 860 se obtuvo el menor porcentaje de polimorfismos (50%) (Tabla 2).

7.3. Índices de diversidad

El análisis de varianza molecular (AMOVA) es un modelo estadístico para la variación molecular en una especie (Meirmans, 2006). El análisis con AMOVA dio como resultado porcentajes de variabilidad dentro y entre poblaciones de 82% y 18% respectivamente. Para determinar las distancias genéticas entre poblaciones se utilizó el coeficiente de Nei y Li (1979) que permite medir la proporción de bandas compartidas entre individuos como resultado de ser heredadas de un ancestro común, y representa la proporción de bandas

presentes y compartidas en ambos individuos dividida por el promedio de proporción de bandas presentes en cada individuo (Mohammadi *et al.*, 2003). De las distancias de Nei obtenidas entre poblaciones, la distancia se dio entre Napo y Zamora Chinchipe (0.086) y la menor entre Napo y Orellana (0.013) (Tabla 3). Se obtuvo un promedio global de heterocigosidad de 0.136, correspondiendo a la población de Napo (0.176) el mayor valor y a la población de Orellana (0.058) el menor valor (Tabla 4). Para el cálculo de los índices de diversidad se excluyó a la provincia de Sucumbíos con el fin de evitar un sesgo ya que estaba conformada por un solo individuo.

Se realizó la prueba pareada de Mantel con 999 permutaciones para evaluar si las distancias genéticas y geográficas se encontraban relacionadas de manera lineal. Se obtuvo un valor de R de 0.0036 por lo que se concluyó que no existe una correlación lineal entre las distancias genética y geográfica de los 157 individuos de guayusa.

7.4. Análisis de PCoA y Clusters

En la Figura 3 se muestra el dendrograma que se obtuvo a partir del análisis de clusters. El dendrograma muestra dos clusters principales. El cluster i incluye en su mayoría a individuos provenientes de la población de Napo, el único individuo de Sucumbíos, un individuo de Orellana, un individuo de Pastaza y dos individuos de Morona Santiago. En el cluster ii se encuentran el resto de individuos de Napo junto con aquellos provenientes de las provincias de Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Los valores de bootstrap obtenidos son bajos. Por ejemplo, el valor del grupo ii es de 0, lo cual no permite afirmar con certeza que las relaciones genéticas encontradas a partir de los ISSRs son

suficientes para agrupar a ciertos individuos en el dendrograma. Por otro lado se obtuvo un valor de bootstrap de 66 para el grupo i, siendo más confiable su agrupación en base a las relaciones genéticas.

La distribución de los individuos de *Ilex guayusa*, en base a sus relaciones genéticas, fue investigada utilizando un PCoA. En la Figura 4 se presenta un plano de dos dimensiones que muestra la distribución de los 157 individuos de guayusa. Las primeras dos coordenadas principales abarcan el 22.99% y 10.99% del total de la variabilidad molecular observada, respectivamente. Los individuos de Napo se encontraron localizados en tres clusters distintos, mayormente en los clusters 1 y 2. En el cluster 1 también se encontraron individuos de Morona Santiago, Orellana y Sucumbíos. En el cluster 2 se encuentran individuos de Orellana y Pastaza. Los individuos de Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe conformaron el cluster 3.

7.5. Estructura poblacional mediante modelo Bayesiano

El $L(K)$ logrado con STRUCTURE no mostró una resolución óptima de las poblaciones de guayusa con un K variando de 1 a 15, por tanto se utilizó el método sugerido por Evanno *et al.* (2005) para calcular la medida ΔK con el fin de inferir los grupos. Se observó un ΔK óptimo en $K=2$ sugiriendo que existen 2 grupos o líneas ancestrales (Figura 5). El primer grupo está conformado por el individuo de Sucumbíos y parte de los individuos de Napo. El segundo grupo está conformado por individuos de Napo y el resto de individuos de las provincias de Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Se puede observar que en las provincias de Orellana y Morona Santiago existen migrantes provenientes del primer grupo, pero la penetrancia de ambos grupos es baja.

8. Discusión

Ilex guayusa es de gran importancia en la Amazonía ecuatoriana. Es una de las especies más utilizadas por los grupos indígenas de esta región constituyendo parte de su vida diaria como una bebida matutina (Innerhofer *et al.*, 2011). Previo a este estudio, no existe información sobre la caracterización y diversidad genética de la guayusa. El conocer sobre la diversidad genética y la relación entre diferentes individuos de una especie puede contribuir a su manejo y cultivo futuros. Obtener esta información a partir de características morfológicas no resulta concluyente ya que éstas son fácilmente influenciadas por factores ambientales y etapas de desarrollo, por tanto no reflejan la diversidad real y relaciones de los individuos. Más aún, el género *Ilex* se caracteriza por una morfología floral muy uniforme entre especies y una morfología de hojas dentro de cada especie muy variable, lo cual ha dificultado la clasificación concisa de sus especies, ya que en un principio estuvo basada en su morfología tanto floral como de hojas. (Loizeau *et al.*, 2005). Estos inconvenientes no se presentan al emplear marcadores de ADN ya que son independientes de los factores mencionados. Los marcadores ISSR son una de las opciones más ampliamente utilizadas para el análisis de diversidad genética ya que son marcadores universales, rápidos y fáciles de aplicar; generan patrones de bandas de gran reproducibilidad y estabilidad obtenida en un rango amplio de condiciones experimentales (Bornet *et al.*, 2001).

Para este estudio, los 9 primers ISSRs empleados amplificaron el 100% de las muestras y dieron un porcentaje de 85.85% de bandas polimórficas. A pesar de este porcentaje de polimorfismos, la mayoría de individuos presentaron un perfil de bandas muy similar como se puede observar en la Figura 2. El hecho de que se haya obtenido perfiles muy similares entre

individuos puede estar relacionado con la hipótesis de la reproducción vegetativa como principal mecanismo de dispersión en la guayusa. Sin reproducción sexual se pierde el mecanismo principal de variación genética que incluye la variación en regiones microsatélites. Las regiones microsatélites poseen una tasa de mutaciones considerablemente mayor a la de otros tipos de ADN y ésta es la base para los polimorfismos encontrados con marcadores ISSR, cuyo poder de discriminación incluye la identificación de variedades de una misma especie (Pradeep, 2002; Zhang *et al.*, 2012).

La baja variabilidad genética que se ve en los perfiles de bandas es corroborada por las distancias genéticas de Nei obtenidas para cada población de guayusa (Tabla 2). La mayor distancia (0.086) se obtuvo entre las población de Napo y la población de Zamora Chinchipe y la menor distancia se obtuvo entre la población de Napo y la población de Orellana (0.013). La guayusa presenta distancias considerablemente menores en comparación a poblaciones silvestres de *Ilex paraguariensis*, una especie cercana del mismo género que posee valores de 0.433 (Gauer *et al.*, 2000). Esto indica una diversidad genética reducida en la guayusa. Por otro lado, se obtuvo un promedio global de heterocigosidad de 0.136; la población de Napo (0.176) presentó el mayor valor y a la población de Orellana (0.058) el menor valor (Tabla 3). Los individuos de la población de Napo tienen dos posibles orígenes distintos, como muestra el análisis con STRUCTURE. El hecho de que el número de individuos muestreados para Napo fue mucho mayor (89 de las 157) en comparación con el número de individuos del resto de poblaciones, también puede ser una de las razones para que la mayoría de diversidad genética se haya encontrado concentrada en la población de Napo.

El valor de heterocigosidad esperada obtenido para *Ilex guayusa* es bajo (0.136), en comparación con el valor de 0.5 reportado para la especie relacionada *Ilex paraguariensis*, en un

estudio realizado en 4 estados de Brasil con 148 individuos en total (Gauer *et al.*, 2000). Valores bajos de heterocigosidad denotan una desviación del equilibrio de Hardy-Weimberg, la cual puede estar relacionado con la propagación clonal de plantas (Van Der Hulst *et al.*, 2003). Esto, junto con el hecho de que otras plantas clonales perennes de vida larga como *Geum reptans*, presentan, al igual que la guayusa, valores de heterocigosidad reducidos (0.22), apoyaría la hipótesis de que la guayusa tiene como principal forma de propagación, la reproducción vegetativa (Pluess *et al.*, 2013).

Como otras plantas cultivadas por el ser humano, la guayusa ha sido propagada de forma vegetativa hasta la actualidad. Se desconoce si la guayusa tiene o tuvo alguna vez la capacidad de reproducirse de forma sexual, pero análisis de su morfología floral sugieren que la reproducción de la guayusa es mayormente o exclusivamente vegetativa (Shemluck, 1979), al igual que otras especies del género como *Ilex leucoclada* (Torimaru, *et al.* 2003). La guayusa tradicionalmente ha sido plantada por estacas. Los avistamientos de plantas en flor son raros y se desconoce si su semilla es viable (Caranqui *et al.*, 2012; Shemluck, 1979).

Con respecto a la variabilidad entre y dentro de las poblaciones, se obtuvieron valores de 18% y 82% respectivamente. Estos valores son muy cercanos a 15% y 85% obtenidos en el estudio de Gauer *et al.* (2000) en Brasil con *Ilex paraguariensis*. En plantas leñosas perennes de vida larga como lo son la guayusa y yerba mate, se ha encontrado este mismo patrón en donde la mayor parte de la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones (Hamrick *et al.*, 1992). Este patrón de mayor variación dentro de la población parece ser independiente del tipo de reproducción, ya que la yerba mate es de polinización cruzada obligada. Por otro lado, el género *Ilex* se caracteriza por tener una baja capacidad de dispersión de polen (Loizeau *et al.*, 2005). Esta característica del género limitaría el flujo génico a distancias cortas en el caso de darse

reproducción sexual, lo cual podría aportar a una mayor variabilidad entre poblaciones, lo cual no se observa con la guayusa, sugiriendo que la reproducción sexual no es uno de los mecanismos principales de propagación, o más aun, no es una opción de propagación para la guayusa (Loizeau *et al.*, 2005).

Las relaciones genéticas de la guayusa con otras especies como la yerba mate pueden verse afectadas por el hecho de que la clasificación actual del género *Ilex* está basada en similitudes morfológicas que no resuelven adecuadamente su filogenia y la alta frecuencia de eventos de hibridación entre linajes (Gottlieb *et al.*, 2005; Loizeau *et al.*, 2005). Inclusive se ha sugerido que *Ilex guayusa* puede ser una subespecie de *Ilex paraguariensis* (Shemluck, 1979), lo cual explicaría los valores similares de varianza molecular obtenidos, en donde la variación dentro de poblaciones es mayor que la variación entre poblaciones (18% y 82% para guayusa, 15% y 85% para yerba mate) (Gauer *et al.*, 2000). Por tanto, es necesario continuar con estudios genéticos más allá del nivel de especie, para conocer de manera más precisa la historia evolutiva de la guayusa y su ubicación dentro del género *Ilex*.

La distribución de los individuos obtenida en el PCoA (Figura 3) muestra a los individuos de Napo en tres clusters distintos; los individuos de Morona Santiago, Orellana y Sucumbíos se encuentran agrupados, en su mayoría, en uno de los clusters; los individuos de Orellana y Pastaza se encuentran en un segundo cluster; y los individuos de Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe conformaron un tercer cluster. Los clusters obtenidos con el PCoA resultan consistentes ya que la variación de las dos primeras coordenadas principales fue abarcó más del 25% de la variación total. El análisis de clusters ha probado ser más sensible y confiable para detectar relaciones genéticas entre genotipos cuando las primeras dos coordenadas principales explican más del 25% de la variación total (Mohammadi *et al.*, 2003).

En el dendrograma (Figura 4) presenta un patrón de agrupación similar al del PCoA, donde los individuos de Napo se encuentran, en su mayoría, en dos clusters. Uno de los clusters (i) se encuentra conformado casi por completo por individuos de Napo, y el segundo cluster (ii) por individuos de Napo e individuos pertenecientes al resto de provincias. Sin embargo, la mayoría de valores de bootstrap obtenidos en el dendrograma no son altamente significativos y no permiten tener un sustento estadístico fuerte para afirmar con certeza que las relaciones genéticas obtenidas se encuentran resueltas. Es necesario incorporar información de un mayor número de loci con el fin de obtener resultados más fiables y confirmar de manera más confiable las agrupaciones obtenidas.

El análisis de estructura poblacional con STRUCTURE mostró la separación de los individuos de guayusa del estudio en dos grupos principales lo cual sugiere la existencia de dos líneas ancestrales (Figura 5). La primera línea ancestral daría origen a parte de los individuos de Napo y Sucumbíos, y la segunda línea ancestral al resto de individuos de la población de Napo y las poblaciones de Orellana, Pastaza, Morona Santiago y Zamora Chinchipe. Esto se ve apoyado con el aumento gradual de las distancias de Nei entre provincias (Tabla 3). La distancia más grande fue entre los individuos de la población de Napo y los individuos de la población de Zamora Chinchipe (0.086), provincias que se encuentran al extremo norte y extremo sur de la Amazonía respectivamente.

La prueba de Mantel no dio una correlación significativa entre la diversidad genética y las distancias geográficas de los individuos analizados en este estudio. Esto indica que la variación genética observada no es producto de una dispersión geográfica gradual de la progenie de los individuos. La recolección de individuos de la población de Napo se dio en localidades próximas del Tena y Archidona por lo que la separación de los individuos de Napo en dos grupos

no resulta ser producto de factores geográficos. La diversidad genética encontrada parece ser producto de individuos provenientes de dos orígenes distintos, uno hacia el límite norte y otro hacia el límite sur de la Amazonía.

Por otro lado, *Ilex guayusa* se encuentra en la Amazonía tanto de Colombia como de Perú, países que limitan al norte y sur de Ecuador respectivamente. En ambos países se han encontrado plantaciones antiguas de guayusa cuyos usos son semejantes a los conocidos en Ecuador (Schultes, 1979). Esto hace necesario el incluir muestras tanto de Perú como de Colombia en futuros análisis con el fin de esclarecer las relaciones genéticas y posible origen de la guayusa.

Los resultados obtenidos en este estudio indican un nivel bajo de diversidad genética dentro de las poblaciones al igual que un nivel bajo de flujo génico. La diversidad genética que presenta la guayusa puede ser producto de su reproducción vegetativa. Varios individuos fundadores provenientes de dos líneas ancestrales pudieron ser propagados en las provincias de la Amazonía, los cuales, junto con mutaciones somáticas, serían los responsables de la diversidad genética actual. (Lacy, 1987; Schultes, 1979). Al ser plantas perennes de vida larga, un individuo de guayusa puede seguir siendo parte de la diversidad genética de una población, sin darse la pérdida de sus alelos (Lacy 1987). Por tanto es imperativo el muestreo de un mayor número de individuos de guayusa en busca de individuos con genotipos únicos con el fin de promover la conservación de esta especie. Debido a que la variabilidad de la guayusa es reducida, la diversidad genética total de una de sus poblaciones puede ser capturada en solo unos pocos individuos silvestres, a partir de los cuales se puede establecer de mejor manera los orígenes y relaciones genéticas de la guayusa (Lacy, 1987).

Una forma de manejar la guayusa de manera sostenible es el uso de sistemas agroforestales, en los cuales árboles y arbustos crecen en conjunto con los cultivos de interés para crear sistemas más eficientes y sostenibles. Los sistemas agroforestales juegan un papel importante en la conservación de la diversidad genética de las especies. Proveen de un hábitat para especies que pueden tolerar un cierto nivel de perturbación, ayudan a preservar el germoplasma de especies sensibles y en general proveen de servicios como control de erosión y recarga de agua previniendo la degradación del hábitat. (McNeely *et al.*, 2006). La guayusa, al presentar una diversidad baja y por tanto una vulnerabilidad a cambios ambientales y otros factores externos, puede beneficiarse de los sistemas agroforestales para su conservación, siendo, a su vez, utilizada como un cultivo de manera sostenible. El manejar sistemas agroforestales con objetivos de conservación requiere el adoptar prácticas de cultivo menos intensivas para lograr la mayoría de beneficios (McNeely *et al.*, 2006; Jose, 2009).

9. Conclusiones

Ilex guayusa presenta un nivel bajo de diversidad genética, en comparación a otras especies del mismo género, que puede ser atribuido a su propagación vegetativa.

La diversidad encontrada es mayor dentro de las poblaciones que entre las poblaciones de guayusa

Existen dos posibles líneas ancestrales, una primera a la que pertenecen individuos de Napo y Sucumbíos, y una segunda a la que pertenecen individuos de Napo e individuos del resto de provincias.

10. Recomendaciones

Obtener un número de muestras equitativo para cada provincia de tal manera que no haya sesgos en los resultados.

Realizar estudios ampliando la recolección de guayusa tanto en Colombia como en Perú con el fin de esclarecer las relaciones genéticas y origen de la guayusa

Resultaría de gran utilidad el incluir muestras de *Ilex paraguariensis* con el fin de establecer relaciones genéticas con *Ilex guayusa*. Esto podría aclarar el origen, posibles líneas ancestrales y relaciones genéticas entre ambas especies (Shemluck, 1979).

Un análisis amplio de las distintas especies *Ilex* de la región permitiría tener una idea más completa sobre las relaciones filogenéticas de este género en Sudamérica.

El analizar la viabilidad de las flores de guayusa podría esclarecer si es posible su reproducción sexual.

11. Bibliografía

- Bennett, B. (1992). *Hallucinogenic Plants of the Shuar and Related Indigenous Groups in Amazonian Ecuador and Peru*. *Brittonia*. 44(4): 483-493.
- Bornet, B. Branchard, M. (2001). *Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and Specific Tools for Genome Fingerprinting*. *Plant Molecular Biology Reporter*. 19: 209–215.
- Caranqui, J. Humanante, A. (2012). *Estudio sobre la Taxonomía y Estado de Conservación de la Guayusa (Ilex guayusa Loess) de Cantón Pastaza*. Fundación Runa Tarpuna. 1-10.
- Crown, P. (2012). *Ritual Black Drink consumption at Cahokia*. *PNAS*. 109(35): 13944-13949.
- Cubero, Jose. (2002). *Introducción a la Mejora Genética Vegetal*. Mundi Prensa. Madrid: 70-80.
- Cuénoud, P. Martinez, M. Loizeau, P. Spichiger, R. Andrews, S. Manen, J. (2000). *Molecular Phylogeny and Biogeography of the Genus Ilex L. (Aquifoliaceae)*. *Annals of Botany*. 85(1): 111-122.
- Escudero, A. Iriondo, J. Torres, M. (2003). *Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation*. *Biological Conservation*. 113: 351-365.
- Esquinas-Alcázar, J. (2005). *Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges*. *Nature*. 6: 946-953.
- Evanno, G. Regnaut, S. Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE; a simulation study*. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.

- Gauer, L. Cavalli-Molina, S. (2000). *Genetic variation in natural populations of maté (Ilex paraguariensis A. St.-Hil., Aquifoliaceae) using RAPD markers*. *Heredity*. 84: 647-656.
- Gottlieb, A. Giberti, G. Poggio, L. (2005). *Molecular Analyses of the Genus Ilex (Aquifoliaceae) in Southern South America, Evidence from AFLP and its Sequence Data*. *American Journal of Botany*. 92(2): 352–369.
- Hamrick, J. Godt, M. Sherman-Broyles, S. *Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species*. *New Forests*. 6: 95-124.
- Hao, D. Gu, X. Xiao, P. Liang, Z. Xu, L. Peng, Y. (2013). *Research progress in the phytochemistry and biology of Ilex pharmaceutical resources*. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 3(1): 8–19.
- Innerhofer, S. Bernhardt, K. (2011). *Ethnobotanic garden design in the Ecuadorian Amazon*. *Biodiversity Conservation*. 20: 429-439.
- Jakobsson, M. Rosenberg, N. (2007). *CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with the label switching and multimodality in analysis of population structure*. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.
- Jose, S. (2009). *Agroforestry for ecosystem services and environmental benefits: an overview*. *Agroforest Syst*. 76: 1-10.
- Lacy, R. (1987). *Loss of Genetic Diversity from Managed Populations: Interacting Effects of Drift, Mutation, Immigration, Selection, and Population Subdivision*. *Conservation Biology*. 1(2): 143-158.
- Loizeau, P. Barriera, G. Manen, J. Broennimann, O. (2005). *Towards an understanding of the distribution of Ilex L. (Aquifoliaceae) on a World-wide scale*. *Bio. Skr*. 55: 501-520.

Lewis, W. Kennelly, E. Bass, G. Wedner, H. Fast, D. (1991) *Ritualistic use of the holly Ilex guayusa by Amazonian Jivaro Indians*. Journal of Ethnopharmacology. 33: 25-30.

McNeely, J. Schroth, G. (2006). *Agroforestry and biodiversity conservation – traditional practices, present dynamics, and lessons for the future*. Biodiversity and conservation. 15: 549-554.

Meirmans, P. (2006). *USING THE AMOVA FRAMEWORK TO ESTIMATE A STANDARDIZED GENETIC DIFFERENTIATION MEASURE*. Evolution. 60(11): 2399-2402.

Mohammadi, S. Prasanna, B. (2003). *Analysis of Genetic Diversity in Crops Plans – Salient Statistical Tools and Considerations*. Crop Science. 43: 1236-1248.

Nei, M. Li, W. (1979). *Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76(10): 5269-5273.

Peakall, R. Smouse, P. (2012). *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. Bioinformatics. 28: 2537-2539.

Perrier, X. Jacquemoud-Collet, J. (2006). *DARwin software* <http://darwin.cirad.fr/>

Pluess, A. Stocklin, J. (2004). *Population Genetic Diversity of the Clonal Plant Geum reptans (Rosaceae) in the Swiss Alps*. American Journal of Botany. 91(12) : 2013-2021.

Pradeep, M. Sarla, N. Siddiq, E. (2002). *Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding*. Euphytica. 128: 9-17.

Reed, D. Frankham, R. (2003). *Correlation between Fitness and Genetic Diversity*. Conservation Biology. 17(1): 230-237.

Rosenberg, N. Pritchard, J. Weber, J. Cann, H. Kidd, K. Zhivotovsky, L. Feldman, M. (2002). *Genetic Structure of Human Populations*. Science. 298: 2381-2385.

Saghai-Marooif, S. Soliman, K. Jorgensen, R. Allard, R. (1984). *Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics (ribosomal DNA spacer-length variation/restriction fragment-length polymorphisms/Rrnl/Rrn2)*. Proc. Natl. Acad. Sci. 81(1): 8014-8018.

Shemluck, M. (1979). The flowers of *Ilex guayusa*. Botanical Museum Leaflets. 27(6): 155-160.

Schultes, R. 1979. *Discovery of an Ancient Guayusa Plantation in Colombia*. Botanical Museum Leaflets. 27(6): 143-153.

Tene, V. Malagón, O. Finzi, P. Vidari, G. Armijos, C. Zaragoza, T. (2007). *An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador*. Journal of Ethnopharmacology. 111: 63-81.

Torimaru, T. Tomaru, N. Nishimura, N. Yamamoto, S. (2003). *Clonal diversity and genetic differentiation in Ilex leuococlada M. patches in an old-growth beech forest*. 12: 809-818.

Van Der Hulst, R. Mes, T. Falque, M. Stam, P. Den Nijs, J. Bachmann, K. (2003). *Genetic structure of a population sample of apomictic dandelions*. Nature Heredity. 90: 326-335.

Zietkiewicz, E. Rafalski, A. Labuda, D. (1994). *Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification*. Genomics. 20(1): 176-183.

Zhou, X. (2009). *Inter-simple Sequence Repeat Molecular Markers in Ilex and the Tissue Culture System of Ilex Cornuta Lindl Ex Paxt*. Henan Agricultural University.

12. Tablas

Tabla 1: Número y procedencia de individuos de guayusa colectados.

| Provincia de origen | Número de individuos |
|---------------------|-----------------------|
| Sucumbíos | 1 |
| Napo | 89 |
| Orellana | 7 |
| Pastaza | 37 |
| Morona Santiago | 11 |
| Zamora Chinchipe | 12 |
| Total | 157 individuos |

Tabla 2: Información de los 9 primers utilizados en el estudio de *Ilex guayusa* mediante ISSRs obtenidos del estudio de Zhou (2009).

| Primer | Secuencia | Número total de bandas | Bandas polimórficas | % de polimorfismo |
|--------|-----------|------------------------|---------------------|-------------------|
| 815 | (CT)8G | 11 | 10 | 90.91 |
| 824 | (TC)8G | 7 | 6 | 85.71 |
| 825 | (AC)8T | 15 | 13 | 86.67 |
| 826 | (AC)8C | 12 | 12 | 100.00 |
| 827 | (AC)8G | 15 | 14 | 93.33 |
| 840 | (GA)8YT | 11 | 10 | 90.91 |
| 846 | (CA)8RT | 11 | 7 | 63.64 |
| 857 | (AC)8YG | 18 | 16 | 88.89 |
| 860 | (TG)8RA | 6 | 3 | 50.00 |
| | Total | 106 | 91 | 85.85 |

Tabla 3: Matriz de distancia genética de Nei de las poblaciones de *Ilex guayusa* comparadas por pares.

| Napo | Orellana | Pastaza | Morona Santiago | Zamora Chinchipe | Provincias |
|-------|----------|---------|-----------------|------------------|-------------------------|
| 0.000 | | | | | Napo |
| 0.013 | 0.000 | | | | Orellana |
| 0.040 | 0.032 | 0.000 | | | Pastaza |
| 0.040 | 0.023 | 0.025 | 0.000 | | Morona Santiago |
| 0.086 | 0.075 | 0.044 | 0.027 | 0.000 | Zamora Chinchipe |

Tabla 4: Heterocigosidad calculada de cada provincia y valores totales.

| Provincia | | N | Na | He | uHe |
|-------------------------|-------------|----------|-----------|-----------|------------|
| Napo | Mean | 89.000 | 1.679 | 0.176 | 0.177 |
| | SE | 0.000 | 0.059 | 0.018 | 0.018 |
| Orellana | Mean | 7.000 | 1.057 | 0.148 | 0.159 |
| | SE | 0.000 | 0.082 | 0.020 | 0.021 |
| Pastaza | Mean | 37.000 | 1.415 | 0.155 | 0.157 |
| | SE | 0.000 | 0.074 | 0.018 | 0.018 |
| Morona Santiago | Mean | 11.000 | 1.094 | 0.144 | 0.150 |
| | SE | 0.000 | 0.081 | 0.019 | 0.020 |
| Zamora Chinchipe | Mean | 12.000 | 0.792 | 0.058 | 0.060 |
| | SE | 0.000 | 0.074 | 0.013 | 0.014 |
| Total | Mean | 31.200 | 1.208 | 0.136 | 0.141 |
| | SE | 1.338 | 0.036 | 0.008 | 0.008 |

Donde N es el número de muestras, Na es el número de alelos diferentes, He es la heterocigosidad esperada y uHe es la heterocigosidad esperada sin sesgos.

13. Figuras

Figura 1: Mapa de la ubicación de las 157 muestras de guayusa, recolectadas.

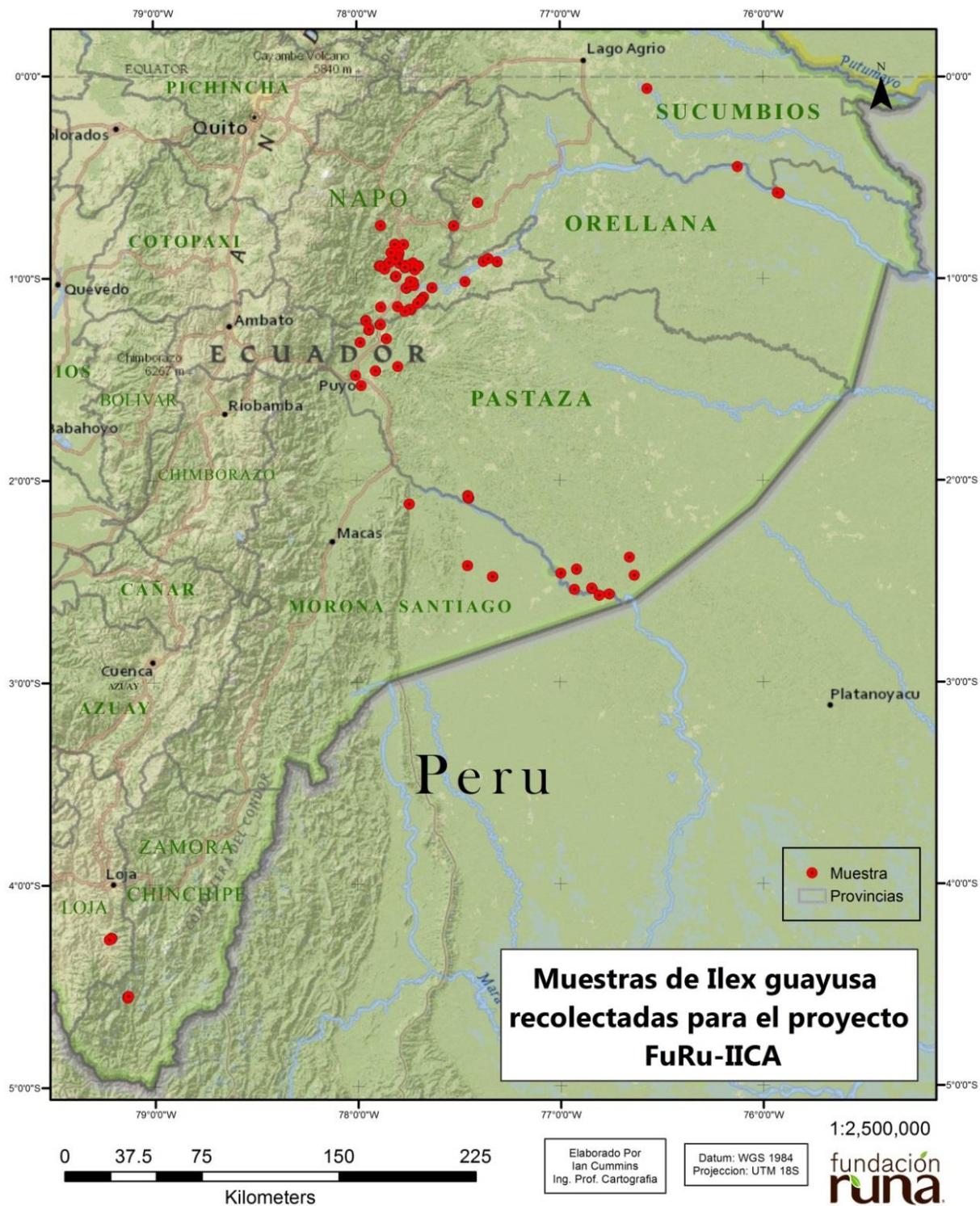


Figura 2: Amplificación con el primer 825 de las muestras 81 a 122 de guayusa. L es el ladder 100 bps de Axygen. En el individuo 109 se puede observar la ausencia de una banda entre 1500 y 1000 bps

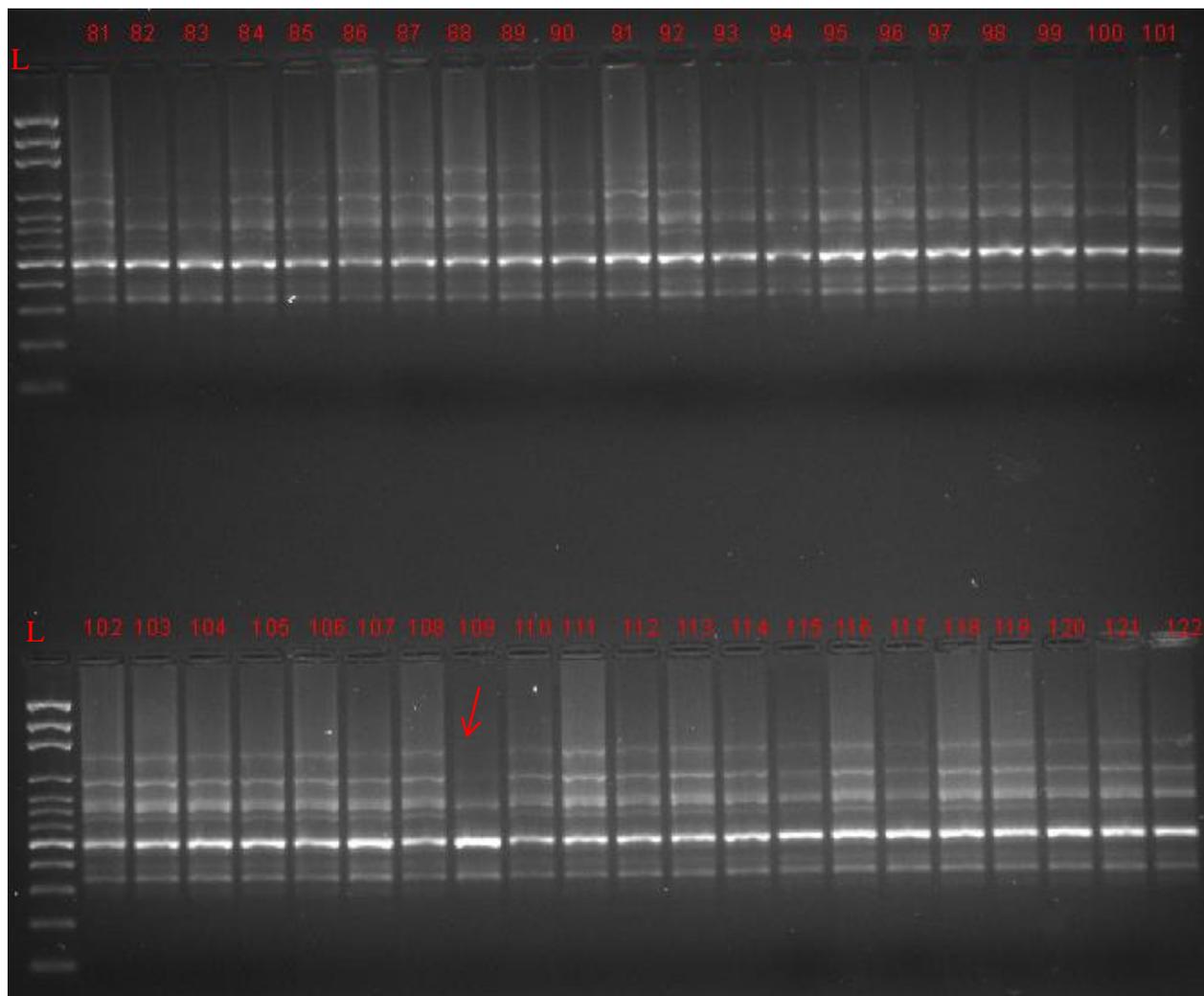


Figura 3: Plano de dos dimensiones de las dos primeras coordenadas del PCoA mostrando la asociación de los 157 individuos de guayusa analizados con 9 primers ISSRs. Los colores representan la provincia de origen de cada individuo: verde Sucumbíos, negro Napo, naranja Orellana, azul Pastaza, rojo Morona Santiago y púrpura Zamora Chinchipe. 1, 2 y 3 representan las agrupaciones principales de los individuos de guayusa.

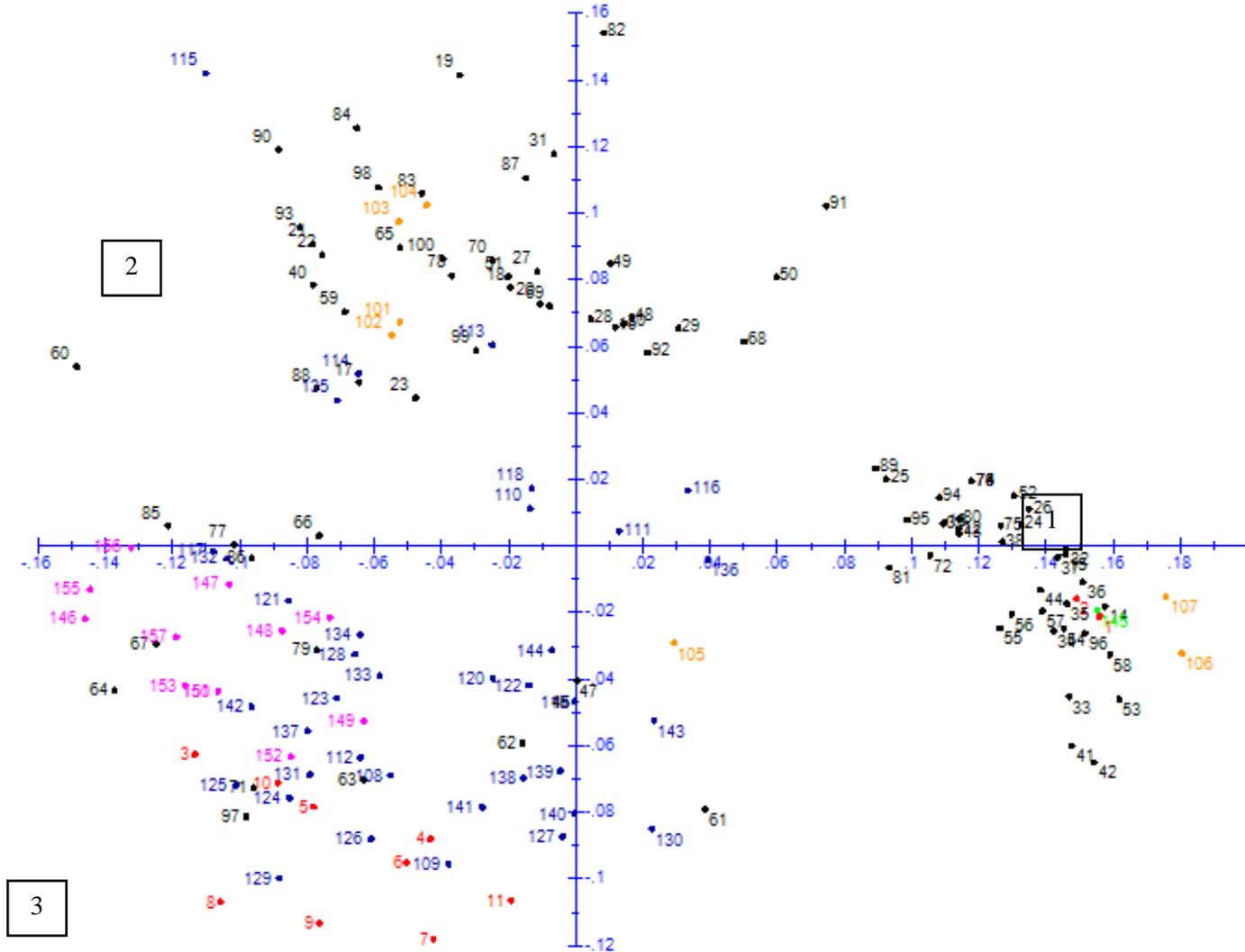


Figura 4: Dendrograma de 157 muestras de *Ilex guayusa*, derivado del análisis Neighbor Joining con los 9 primers ISSRs. Los números en las ramificaciones son valores de bootstrap obtenidos con 500 re-muestréos. Los colores representan la provincia de origen de cada individuo: Verde Sucumbíos, negro Napo, naranja Orellana, azul Pastaza, rojo Morona Santiago y púrpura Zamora Chinchipe. i e ii representan las agrupaciones principales de los individuos de guayusa

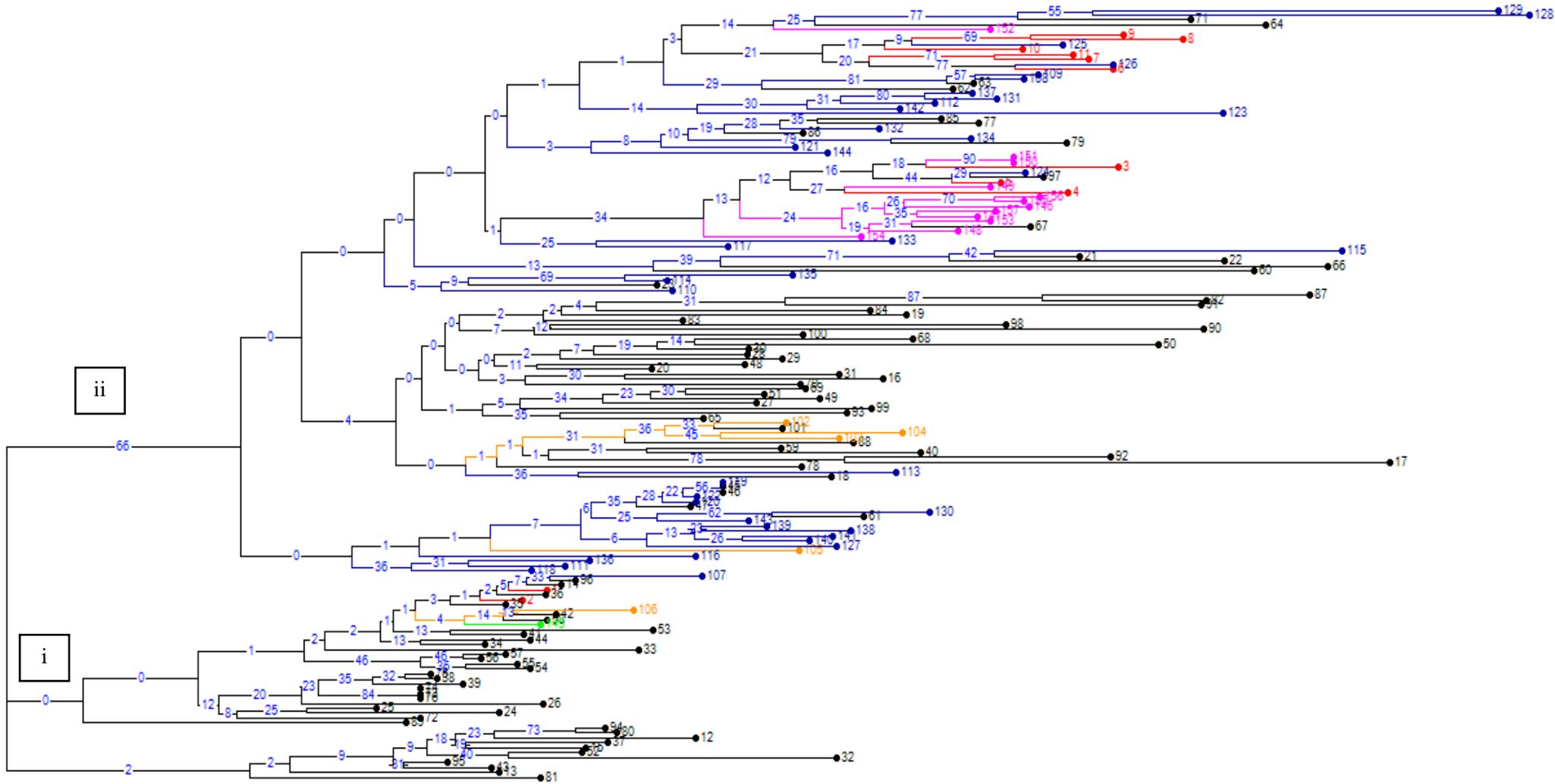
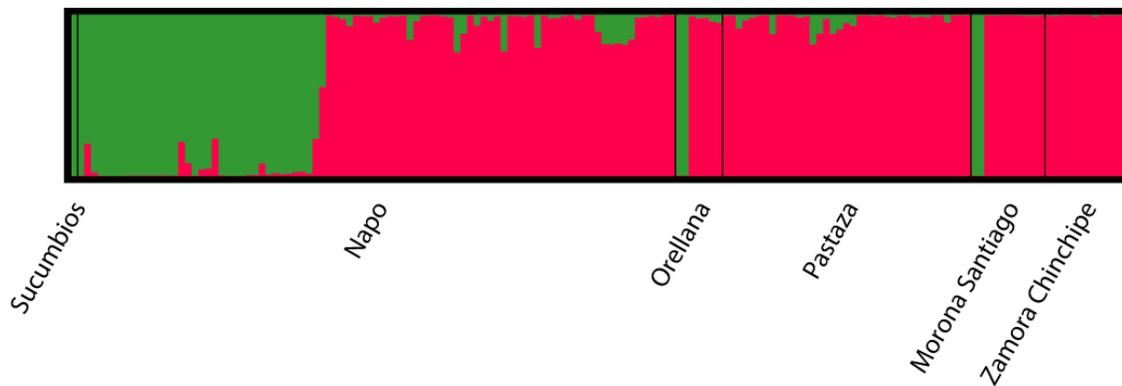


Figura 5: Grafico de asignación de coeficiente ancestral de los individuos investigados para un modelo poblacional $K=2$. Los subgrupos identificados por STRUCTURE se encuentran indicados en color verde y rojo.



14. Anexos

Anexo 1A: Información de origen de las muestras recolectadas de *Ilex guayusa* en la Amazonía ecuatoriana.

| Muestra | Comunidad | Provincia | Fecha de Recolección | Latitud | Longitud |
|---------|-------------|-----------------|----------------------|---------|----------|
| G1 | Wisum | Morona Santiago | 01/10/2012 | 2.1187 | 77.7409 |
| G3 | Wisum | Morona Santiago | 01/05/2013 | 2.1187 | 77.7409 |
| PUM3 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4787 | 77.3319 |
| PAN3 | Panki | Morona Santiago | 03/05/2013 | 2.4233 | -77.455 |
| PUM6 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4787 | 77.3319 |
| PAN1 | Panki | Morona Santiago | 03/05/2013 | 2.4233 | -77.455 |
| PAN2 | Panki | Morona Santiago | 03/05/2013 | 2.4233 | -77.455 |
| PUM1 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4787 | 77.3319 |
| PUM2 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4795 | 77.3302 |
| PUM5 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4787 | 77.3319 |
| PUM4 | Pumbuentza | Morona Santiago | 04/05/2013 | 2.4787 | 77.3319 |
| INC1 | Inchillaqui | Napo | 10/04/2013 | -0.922 | -77.838 |
| INC2 | Inchillaqui | Napo | 10/04/2013 | -0.922 | -77.838 |
| INC3 | Inchillaqui | Napo | 10/04/2013 | -0.922 | -77.838 |
| INC4 | Inchillaqui | Napo | 10/04/2013 | -0.922 | -77.838 |
| CNO3 | Alto Tena | Napo | 26/10/2012 | 0.94 | 77.8763 |
| CNO4 | Alto Tena | Napo | 26/10/2012 | 0.94 | 77.8763 |
| CNO1 | Alto Tena | Napo | 26/10/2012 | 0.94 | 77.8763 |
| CNO2 | Alto Tena | Napo | 26/10/2012 | 0.94 | 77.8763 |
| ALT5 | Alto Tena | Napo | 21/03/2013 | 0.9389 | -77.88 |
| ALT6 | Alto Tena | Napo | 21/03/2013 | 0.9394 | 77.8795 |
| ATT1 | Alto Tena | Napo | 01/03/2013 | -0.94 | -77.886 |
| ATT4 | Alto Tena | Napo | 01/03/2013 | 0.9401 | 77.8812 |

| | | | | | |
|---------|--------------|------|------------|-------|---------|
| ATT3 | Alto Tena | Napo | 01/03/2013 | - | - |
| ATT2 | Alto Tena | Napo | 01/03/2013 | -0.94 | 77.8807 |
| ATCP1 | Atacapi | Napo | 21/03/2013 | - | - |
| SRA3 | Santa Rita | Napo | 21/02/2013 | - | - |
| SRA2 | Santa Rita | Napo | 21/02/2013 | - | - |
| SRA1 | Santa Rita | Napo | 21/02/2013 | - | - |
| M1 | Mondayacu | Napo | 29/09/2012 | - | - |
| PON2 | Ponceloma | Napo | 25/04/2013 | - | - |
| PON1 | Ponceloma | Napo | 25/04/2013 | - | - |
| 10AS4 | 10 de Agosto | Napo | 19/02/2013 | - | - |
| 10AS3 | 10 de Agosto | Napo | 19/02/2013 | - | - |
| 10AS2 | 10 de Agosto | Napo | 19/02/2013 | - | - |
| 10AS1 | 10 de Agosto | Napo | 19/02/2013 | - | - |
| PAR1 | Alto Para | Napo | 12/03/2013 | - | - |
| RUK2 | Rukullakta | Napo | 01/03/2013 | - | - |
| RUK1 | Rukullakta | Napo | 01/03/2013 | - | - |
| UMB3 | Umbuni | Napo | 20/05/2013 | - | - |
| UMB1 | Umbuni | Napo | 20/05/2013 | - | - |
| UMB2 | Umbuni | Napo | 20/05/2013 | - | - |
| Pu10AS1 | Pachakutik | Napo | 19/02/2013 | - | - |
| PAP3 | Papanku | Napo | 21/05/2013 | - | - |
| PAP2 | Papanku | Napo | 21/05/2013 | - | - |
| PAP1 | Papanku | Napo | 21/05/2013 | - | - |

| | | | | | |
|-------|-------------------------|------|------------|--------|---------|
| SLSP3 | San Luis | Napo | 07/03/2013 | -0.937 | -77.744 |
| SLSP2 | San Luis | Napo | 07/03/2013 | 0.9364 | 77.7394 |
| SLSP1 | San Luis | Napo | 07/03/2013 | 0.9349 | 77.7388 |
| SMA1 | Santa María | Napo | 12/03/2013 | 0.9033 | 77.8062 |
| 20MC3 | 20 de Mayo | Napo | 05/03/2013 | 0.8319 | 77.8104 |
| 20MC2 | 20 de Mayo | Napo | 05/03/2013 | 0.8319 | 77.8104 |
| 20MC1 | 20 de Mayo | Napo | 05/03/2013 | 0.8318 | 77.8109 |
| SJS1 | San José | Napo | 01/03/2013 | 0.9269 | 77.7872 |
| CMSP1 | Centro Mamallacta | Napo | 07/03/2013 | 0.9365 | 77.7582 |
| CAP2 | Capirona | Napo | 27/02/2013 | 1.0929 | -77.67 |
| CAP1 | Capirona | Napo | 27/02/2013 | 1.1065 | 77.6816 |
| PCT1 | Puni Kotona | Napo | 23/05/2013 | -1.156 | 77.7311 |
| SD2 | Santo Domingo de Hollín | Napo | 14/03/2013 | 0.9465 | 77.7613 |
| SD3 | Santo Domingo de Hollín | Napo | 14/03/2013 | 0.9484 | 77.7605 |
| SD1 | Santo Domingo de Hollín | Napo | 14/03/2013 | 0.9463 | 77.7613 |
| SCT2 | San Clemente A T | Napo | 08/02/2013 | 1.1433 | 78.8797 |
| SCT1 | San Clemente A T | Napo | 08/02/2013 | 1.1433 | 78.8797 |
| SASP1 | Salazar Aytaka | Napo | 12/03/2013 | 0.9592 | 77.7107 |
| ATA3 | Atahualpa | Napo | 28/02/2013 | 1.0501 | 77.7534 |
| ATA2 | Atahualpa | Napo | 28/02/2013 | 1.0476 | 77.7544 |
| ATA1 | Atahualpa | Napo | 27/02/2013 | 1.0484 | -77.756 |
| MACH1 | Machacuyacu | Napo | 25/04/2013 | 1.0315 | 77.7191 |
| AWA1 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | 1.0478 | 77.6272 |

| | | | | | |
|-------|---------------------------|------|------------|--------|---------|
| AWA2 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | - | - |
| AWA5 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | 1.0478 | 77.6272 |
| AWA3 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | - | - |
| AWA4 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | 1.0478 | 77.6272 |
| AWA6 | Awatino | Napo | 29/09/2012 | - | - |
| SICP1 | San Isidro | Napo | 21/03/2013 | 1.0175 | 77.4653 |
| SICP2 | San Isidro | Napo | 21/03/2013 | - | - |
| MUS3 | Mushullacta | Napo | 21/05/2013 | 0.7901 | 77.6486 |
| MUS1 | Mushullacta | Napo | 21/05/2013 | - | - |
| MUS2 | Mushullacta | Napo | 21/05/2013 | 0.7901 | 77.6486 |
| PUI1 | Puni Ishpingo | Napo | 23/05/2013 | - | - |
| ALTC2 | Alto Copa | Napo | 18/04/2013 | 1.1651 | 77.7603 |
| ALTC3 | Alto Copa | Napo | 18/04/2013 | 0.9396 | 77.6931 |
| ALTC1 | Alto Copa | Napo | 18/04/2013 | - | - |
| KM1 | Km 36 via Tena Quito | Napo | 18/04/2013 | 0.9385 | 77.6932 |
| SCCP1 | San Cristobal de Chonta P | Napo | 18/04/2013 | -0.94 | 77.6947 |
| SECP2 | Santa Estefanía de ChonPu | Napo | 29/09/2012 | 0.8764 | -77.79 |
| SECP1 | Santa Estefania de ChPun | Napo | 21/03/2013 | - | - |
| RYCP1 | Rayayacu de Chonta Punta | Napo | 21/03/2013 | 0.9174 | -77.376 |
| PAR2 | Parayacu | Napo | 21/03/2013 | 0.9029 | 77.3511 |
| GUA2 | Guamaní | Napo | 21/03/2013 | - | - |
| GUA3 | Guamaní | Napo | 21/03/2013 | 0.9029 | 77.3511 |
| GUA1 | Guamaní | Napo | 21/03/2013 | -0.917 | 77.3073 |
| | | | | - | - |
| | | | | 0.9394 | 77.7112 |
| | | | | - | - |
| | | | | 0.7182 | 77.6097 |
| | | | | - | - |
| | | | | 0.7182 | 77.6097 |
| | | | | - | - |
| | | | | 0.7182 | 77.6097 |

| | | | | | |
|-------|---------------------------|----------|------------|-------------|--------------|
| SVN1 | San Vicente de Arosemena | Napo | 23/05/2013 | - 1.1408 | - 77.7975 |
| LH5 | Las Hierbitas | Napo | 03/03/2013 | - 0.9921 | - 77.8075 |
| LH4 | Las Hierbitas | Napo | 03/03/2013 | - 0.9919 | - 77.8073 |
| LH3 | Las Hierbitas | Napo | 03/03/2013 | - 0.9899 | - -77.805 |
| LH2 | Las Hierbitas | Napo | 03/03/2013 | - 0.9899 | - -77.805 |
| LH1 | Las Hierbitas | Napo | 03/03/2013 | - 0.9899 | - -77.805 |
| QC3 | Quisacocha | Napo | 27/02/2013 | - -1.108 | - 77.6821 |
| QC2 | Quisacocha | Napo | 27/02/2013 | - 1.1133 | - 77.6858 |
| QC1 | Quisacocha | Napo | 27/02/2013 | - 1.1237 | - 77.6988 |
| KM2 | Km 36 via Tena Quito | Napo | 29/09/2012 | - 0.8764 | - -77.79 |
| AVIV4 | Ávila Viejo | Orellana | 13/04/2013 | - 0.6251 | - 77.4034 |
| AVIV5 | Ávila Viejo | Orellana | 13/04/2013 | - 0.6251 | - 77.4034 |
| AVIV2 | Ávila viejo | Orellana | 13/04/2013 | - 0.6251 | - 77.4034 |
| AVIV1 | Ávila Viejo | Orellana | 13/04/2013 | - 0.6251 | - 77.4034 |
| AVIV3 | Ávila Viejo | Orellana | 13/04/2013 | - 0.6251 | - 77.4034 |
| CI1.1 | Chiro Islas | Orellana | 31/10/2012 | - 0.5802 | - 75.9181 |
| SA1.1 | Samuna | Orellana | 31/10/2012 | - 0.5766 | - 75.9294 |
| SFP4 | San Francisco de Puní | Pastaza | 22/05/2013 | - 1.2994 | - 77.8526 |
| CHU1 | Chumpi | Pastaza | 06/04/2013 | - 2.0897 | - 77.4482 |
| SRSC1 | San Rafael de Santa Clara | Pastaza | 16/04/2013 | - -1.253 | - 77.9369 |
| BOY1 | Boayacu | Pastaza | 16/04/2013 | - 1.3169 | - -77.982 |
| SRSC2 | San Rafael de Santa Clara | Pastaza | 16/04/2013 | - 1.2574 | - 77.9382 |
| BOY2 | Boayacu | Pastaza | 16/04/2013 | - 1.3169 | - -77.982 |

| | | | | | |
|-----------------|-----------------------|---------|------------|--------|---------|
| COP3 | Copataza | Pastaza | 06/04/2013 | - | - |
| | | | | 2.0875 | 77.4513 |
| COP4 | Copataza | Pastaza | 06/04/2013 | - | - |
| | | | | 2.0875 | 77.4513 |
| SJP1 | San Juan de Piatua | Pastaza | 20/03/2013 | - | - |
| | | | | 1.2118 | 77.9524 |
| SJP3 | San Juan de Piatua | Pastaza | 20/03/2013 | - | - |
| | | | | 1.2093 | -77.953 |
| SJP2 | San Juan de Piatua | Pastaza | 20/03/2013 | - | - |
| | | | | 1.2118 | 77.9524 |
| COP2 | Copataza | Pastaza | 05/04/2013 | - | - |
| | | | | 2.0773 | 77.4526 |
| COP1 | Copataza | Pastaza | 05/04/2013 | - | - |
| | | | | 2.0778 | 77.4514 |
| Kapapas | Kapawi | Pastaza | 15/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5365 | 76.8426 |
| Ishpink1 | Ishpingo | Pastaza | 14/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5657 | 76.7572 |
| Tinkpas2 | Tinkias | Pastaza | 15/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.4723 | 76.6344 |
| Kapapas4 | Kapawi | Pastaza | 14/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5373 | 76.8437 |
| Waychirpa s1 | Waychirpas | Pastaza | 15/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5717 | 76.8072 |
| Kapapas3 | Kapawi | Pastaza | 14/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5364 | 76.8433 |
| SUWPAS1 | Suwa | Pastaza | 14/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5421 | 76.9287 |
| Sharm2 | Sharmentza | Pastaza | 13/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.4619 | 76.9958 |
| Tinkpas1 | Tinkias | Pastaza | 15/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.4723 | 76.6344 |
| Chirpas1 | | Pastaza | 16/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.3827 | 76.6584 |
| Waychirpa s2 | Waychirpas | Pastaza | 15/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5717 | 76.8072 |
| Sharm1 | Sharmentza | Pastaza | 13/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.4619 | 76.9958 |
| Kapapas2 | Kapawi | Pastaza | 14/06/2013 | - | - |
| | | | | 2.5364 | 76.8433 |
| SFP1 | San Francisco de Puní | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| | | | | 1.2993 | 77.8518 |
| REY2 | Rey del Oriente | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| | | | | 1.2293 | 77.8818 |
| MUP1 | Mushullacta | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| | | | | 1.5321 | 77.9772 |

| | | | | | |
|-------|-----------------------|-------------------|------------|---|---|
| REY1 | Rey del Oriente | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| SFP2 | San Francisco de Puní | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| TRI1 | El Triunfo | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| 10AP2 | 10 de Agosto | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| 10AP1 | 10 de Agosto | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| PUY1 | Puyo | Pastaza | 22/05/2013 | - | - |
| T1 | Tereré | Sucumbíos | 30/10/2012 | - | - |
| VILC4 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VILC6 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VILC1 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 13/06/2013 | - | - |
| VILC5 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VILC2 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 13/06/2013 | - | - |
| VILC3 | Vilcabamba | Zamora Chinchi | 13/06/2013 | - | - |
| VALL6 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VALL1 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VALL3 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VALL5 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VALL2 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |
| VALL4 | Valladolid | Zamora Chinchi | 14/06/2013 | - | - |