

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales (COCIBA)

**Determinación de la diversidad genética de la guayaba
Psidium guajava en Ecuador continental**

Proyecto de investigación

Alison Tamara Reinoso Medina

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de Ingeniería en proceso biotecnológicos

Quito, 23 de Mayo de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIODE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

Determinación de la diversidad genética de la guayaba *Psidium guajava* en Ecuador continental

Alison Tamara Reinoso

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Quito, 23 de mayo de 2019

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:

Alison Tamara Reinoso Medina

Código:

00126353

Cédula de Identidad:

1721089322

Lugar y fecha:

Quito, mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi mamá por darme su apoyo incondicional y siempre estar a mi lado. A mis abuelos por ser una parte importante de mi vida.

Quiero agradecer a María de Lourdes Torres por brindarme esta oportunidad, por enseñarme y por motivarme a ser una gran profesional.

Quiero agradecer a quienes conforman el Laboratorio de Biotecnología Vegetal por toda su ayuda, en especial a Diego Urquía, Gabriela Pozo, María José Pozo y Juan José Guadalupe.

Quiero agradecer a la Universidad San Francisco de Quito.

Finalmente, quiero agradecer a Luis Espíndola por apoyarme durante todo el transcurso de la realización de mi proyecto de titulación al igual que todas las maravillosas personas que formaron parte de estos 5 años de carrera.

RESUMEN

La guayaba, *Psidium guajava* L., es una especie invasora en las Islas Galápagos debido a que posee características que le permiten extenderse y colonizar nuevos territorios con gran facilidad. Estas características consisten en la facultad de reproducirse tanto sexual como asexualmente, poseer un crecimiento acelerado y una fácil dispersión de sus semillas. El archipiélago de Galápagos representa un sistema frágil por lo que las especies exóticas que se convierten en invasoras representan una amenaza para el ecosistema y para la biodiversidad de las Islas. Por este motivo, es importante conocer la diversidad genética de esta especie en Ecuador continental para poder entender su historia de invasión y esclarecer el origen de procedencia de la guayaba en las Islas Galápagos.

En este trabajo de investigación se recolectó tejido vegetal de 96 individuos de *P. guajava* en 19 provincias de Ecuador continental. Luego, se realizó la amplificación con 12 marcadores microsatélites mediante la técnica de PCR. Se encontró una heterocigosidad esperada global de 0.7, lo cual indica una diversidad genética moderadamente alta en la muestra de guayaba analizada en Ecuador continental. Por otro lado, a pesar de que no se evidencia una estructura poblacional, se observa la predominancia de 3 linajes que se distribuyen en las zonas Norte, Centro y Sur del Ecuador. Se puede sugerir que la población de guayaba en las Islas Galápagos proviene de la zona Sierra Centro del Ecuador, en la cual constan las provincias de Tungurahua, Bolívar y norte del Azuay; sin embargo, no se descarta un aporte de la zona Sur del continente. Además, se propone que se dio únicamente un proceso de introducción de guayaba en las Islas Galápagos, posiblemente en la Isla San Cristóbal. Los estudios de diversidad genética pueden contribuir a reconstruir la historia de invasión de una especie y de esta manera apoyar a programas de control de especies introducidas en ecosistemas insulares.

Palabras clave: Guayaba, *Psidium guajava*, plantas invasoras, microsatélites, diversidad genética

ABSTRACT

The guava, *Psidium guajava* L., is an invasive species in the Galapagos Islands because of its characteristics that allow it to spread and colonize new territories easily. Guava has the ability to reproduce sexually and asexually, has an accelerated growth and produce many seeds. The Galápagos Islands is a fragile natural system and for this reason invasive species represent a threat to the ecosystem and to the biodiversity of the Islands. Thus, it is important to know the genetic diversity of this specie in mainland Ecuador to be able to understand its invasive history and clarify the origin of guava in the Galapagos Islands.

In this research, we collected tissue from 96 individuals of *P. guajava* in 19 provinces of mainland Ecuador. Then, 12 homologous microsatellite were amplified through PCR. An expected global heterozygosity of 0.7 was found, which indicates a high genetic variability in the guava sample analyzed in the continent. On the other hand, we couldn't find a defined population structure but the presence of 3 lineages was observed. These lineages are distributed in the North, Center and South zones of mainland Ecuador. Finally, we can suggest that the population of guava in the Galapagos Islands comes from the Central Zone of mainland Ecuador, specifically from the provinces of Tungurahua, Bolívar and north of Azuay. However, a contribution from the southern zone of the continent cannot be ruled out. In addition, it is proposed that there was only one introduction of guava in the Galapagos Islands, possibly in San Cristobal. Studies of genetic diversity can help reconstructing the history of the invasion of species allowing the establishment of control programs for the introduced species in insular ecosystems.

Key words: Guava, *Psidium guajava*, invasive plants, microsatellites, genetic diversity

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|----|
| Derechos de autor | 3 |
| Resumen..... | 5 |
| Abstract | 6 |
| Tabla de contenido | 7 |
| Índice de Tablas | 9 |
| Índice de Figuras | 10 |
| Índice de Anexos | 12 |
| 1 Introducción | 13 |
| 1.1 <i>Psidium guajava</i> | 13 |
| 1.2 Plantas invasoras | 14 |
| 1.3 Islas Galápagos y especies invasoras | 15 |
| 1.4 Importancia de la diversidad genética en planes de control para la erradicación de plantas invasoras | 17 |
| 1.5 Marcadores moleculares | 18 |
| 2 Objetivos | 20 |
| 2.1 Objetivo General | 20 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 20 |
| 3 Justificación | 21 |
| 4 Área de estudio | 22 |
| 5 Materiales | 23 |
| 5.1 Recolección material vegetal | 23 |
| 5.2 Extracción de ADN genómico | 23 |
| 5.3 Análisis del ADN genómico extraído | 23 |
| 5.4 Amplificación de regiones microsatélite | 24 |
| 5.5 Electroforesis en gel de agarosa..... | 24 |
| 5.6 Genotipado | 24 |
| 5.7 Análisis estadístico | 25 |
| 6 Métodos..... | 26 |
| 6.1 Recolección de muestras de <i>Psidium guajava</i> en Ecuador continental..... | 26 |

| | |
|--|----|
| 6.2 Extracción y cuantificación de ADN de los individuos de <i>Psidium guajava</i> | 26 |
| 6.3 Amplificación del ADN utilizando marcadores microsatélites | 27 |
| 6.4 Determinación del genotipo de los individuos de <i>P. guajava</i> | 29 |
| 6.5 Análisis de datos | 29 |
| 6.6 Estructura poblacional | 31 |
| 6.7 Modelos de introducción de <i>P. guajava</i> en las Islas Galápagos | 32 |
| 7 Resultados | 34 |
| 7.1 Extracción y cuantificación de ADN de los individuos de <i>Psidium guajava</i> | 34 |
| 7.2 Amplificación del ADN utilizando marcadores microsatélites | 34 |
| 7.3 Determinación del genotipo de los individuos de <i>P. guajava</i> | 35 |
| 7.4 Análisis de índices de diversidad genética..... | 35 |
| 7.5 Estructura poblacional | 36 |
| 7.6 Evaluación de patrones de introducción | 39 |
| 8 Discusión | 40 |
| 8.1 Diversidad genética..... | 40 |
| 8.2 Estructura poblacional de los individuos de <i>Psidium guajava</i> en Ecuador continental | 42 |
| 8.3 Estructura poblacional de los individuos de <i>Psidium guajava</i> en Ecuador continental versus Islas Galápagos | 44 |
| 8.4 Evaluación de patrones de introducción | 46 |
| 9 Conclusiones | 49 |
| 10 Recomendaciones | 50 |
| 11 Referencias bibliográficas | 51 |
| 12 Tablas | 55 |
| 13 Figuras | 59 |
| 14 Anexos | 68 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Secuencias de los 13 loci microsatélites utilizados para la amplificación de los individuos de <i>P. guajava</i> | 55 |
| Tabla 2 Agrupación de las provincias donde se recolectaron individuos de <i>P. guajava</i> en poblaciones por región y por eje de norte a sur. Se observan las localidades que corresponden a cada provincia..... | 55 |
| Tabla 3 Loci microsatélite que fueron utilizados en este estudio y los fluoróforos correspondientes a cada locus. Además, se indica la temperatura de hibridación y el número de ciclos que fue utilizado..... | 56 |
| Tabla 4 Indicadores de diversidad genética de cada locus microsatélite utilizado en este estudio para los individuos de <i>P. guajava</i> de Ecuador continental | 56 |
| Tabla 5 Indicadores de diversidad genética para los individuos de <i>P. guajava</i> de Ecuador continental. Para cada una de las poblaciones se muestra el número de alelos, heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el número de alelos privados | 57 |
| Tabla 6 Distancias genéticas de Nei entre las 9 poblaciones establecidas de Ecuador continental..... | 57 |
| Tabla 7 Coeficiente F_{st} entre las 9 regiones establecidas de Ecuador continental | 58 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Ejemplo de un individuo de *Psidium guajava* recolectado en Ecuador continental en la localidad Pedro Vicente en la provincia de Pichincha.....59
- Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN genómico extraído de individuos de *P. guajava* utilizando el método de extracción con CTAB..... 59
- Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación mediante técnica de PCR. Los diferentes carriles corresponden a los individuos de *P. guajava* recolectados en Ecuador continental, siendo las muestras pertenecientes a las localidades Carlos Arosemena (CA), Misahualli (Mi), Borja (Bj) y Santa Cecilia (SCe), los cuales fueron amplificados utilizando diferentes loci, en este caso mPgCIR08, mPgCIR07 y mPgCIR11. Los primeros pocillos de cada carril corresponde al Ladder de referencia de 100bp de Invitrogen. Los carriles C+ y C-, corresponden a los controles positivos y negativo, respectivamente..... 60
- Figura 4 Mapa de Ecuador que muestra las localidades muestreadas y las divisiones de norte a sur realizadas con el fin de agrupar los individuos en tres zonas: Norte, centro y sur..... 60
- Figura 5 Escenarios de análisis de origen de *P. guajava* en Islas Galápagos utilizando el programa DIYABC. a) Escenario 1. b) Escenario 2. c) Escenario 3. Se debe mencionar que en todos los escenarios Pop1, Pop2 y Pop3 son los individuos de Ecuador continental divididos en base a los tres linajes reportados en STRUCTURE, siendo Pop1 linaje rojo, Pop2 linaje verde y Pop 3 linaje amarillo. Pop4 constituye a todos los individuos de las islas Santa Cruz, San Cristóbal e Isabela.....61
- Figura 6 Escenarios de los patrones de introducción de *P. guajava* en Islas Galápagos utilizando el programa DIYABC. a) Escenario 1. b) Escenario 2. c) Escenario 3. d) Escenario 4. Se debe mencionar que en todos los escenarios Pop1 corresponde a los individuos de Ecuador continental, Pop2 son los individuos de Isabela, Pop3 es la población de Santa Cruz y finalmente Pop4 es San Cristóbal..... 62
- Figura 7 Número de alelos de cada uno de los loci microsatélites utilizados en este estudio..... 63
- Figura 8 Media de las frecuencias de los coeficientes de endogamia de los 96 individuos de *P. guajava* de Ecuador continental 63
- Figura 9 PCoA de los individuos de *P. guajava* de las poblaciones definidas de Ecuador continental. En la leyenda se indican los colores que corresponden a cada población de Ecuador continental y a cada una de las tres islas de Galápagos..... 64
- Figura 10 PCoA de los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental y de las Islas Galápagos, específicamente de San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela. En la leyenda se indican los colores que corresponden a cada población de Ecuador continental y a cada una de las tres islas de Galápagos..... 64

Figura 11 Dendograma Neighbor Joining de las poblaciones de *Psidium guajava* analizadas. a) Dendograma Neighbor Joining de la muestra poblacional de Ecuador continental en donde la longitud de las ramas corresponde a la distancia genética existente entre cada población. b) Dendograma Neighbor joining que incluye a las poblaciones de Ecuador continental, Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal..... 65

Figura 12 Análisis de STRUCTURE de los individuos de las poblaciones que pertenecen a Ecuador continental agrupados por su región y zona latitudinal. a) Este resultado considera un K óptimo de 3 en base a un $\Delta K=84.13$. b) Gráfico de STRUCTURE con un K=2 que posee un $\Delta K=0.49$ 66

Figura 13 Prueba de Mantel de los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental.....66

Figura 14 Resultados de STRUCTURE incluyendo a los individuos del continente y del archipiélago. a) Resultado considerando el K óptimo de 2 que tenía un valor de $\Delta K= 737.29$. b) Gráfico de STRUCTURE con un K=3, segundo mejor valor con un $\Delta K=58.38$ 67

ÍNDICE DE ANEXOS

| | |
|--|----|
| Anexo A Provincias de recolección de los individuos de <i>Psidium guajava</i> en Ecuador continental. Se indican las localidades pertenecientes a cada provincia, el nombre de la muestra, las coordenadas y la altitud geográfica a la que los individuos fueron muestreados en la salida de campo realizada en los meses de Mayo, Junio y Julio de 2017..... | 68 |
| Anexo B Individuos seleccionados para el proceso de amplificación, para cada muestra se indica los resultados de la cuantificación de ADN utilizando NanoDrop..... | 73 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Psidium guajava*

La especie *Psidium guajava* comúnmente conocida como guayaba o guayabo, tiene su origen en las zonas tropicales del centro y sur de América. Esta especie pertenece a la familia Myrtaceae, la cual contiene alrededor de 150 géneros y más de 5 650 especies. La guayaba es una especie diploide que se caracteriza por ser un árbol o arbusto caducifolio con una longevidad promedio de 30 a 40 años que puede llegar a medir de 3 a 10 metros, posee una copa irregular con hojas elípticas decusadas simples con margen entero siendo sus hojas de un color verde brillante u opaco (Sanabria, et al., 2005). Su tronco tiende a ser irregular y con una gran cantidad de ramificaciones siendo su corteza externa escamosa con un color pardo rojizo. La guayaba produce flores axilares que pueden ser a manera de cimbras o solitarias que van a poseer de 4 a 5 pétalos de color blanco, además produce un fruto carnoso en forma de baya que puede llegar a medir hasta 8 cm de diámetro, en donde su pulpa puede llegar a ser de color crema a rosado dependiendo de la variedad (Rodríguez, et al., 2004).

Su hábitat se caracteriza por diversas condiciones climáticas ya que puede encontrarse en zonas de climas secos, cálidos o templados dado que el rango de temperatura adecuado para su desarrollo va desde los 15 a 30°C. Sin embargo, puede llegar a tolerar incluso temperaturas de hasta 45°C y sus requerimientos pluviales pueden ir de 1000 a 2000 mm, pero se ha evidenciado el crecimiento de esta especie en zonas con precipitaciones de hasta 5 000mm anuales. La guayaba tolera una amplia variedad de condiciones de suelo, pero tiende a crecer mejor en suelos con alto contenido orgánico. Cabe destacar que esta especie es tolerante a suelos ácidos o alcalinos mostrando crecimiento a un pH de 4.5 a 9.4 (Cázares, et al., 2008). Es común encontrarle a la orilla de caminos y cerca de las casas, donde en varias ocasiones se le considera como una plaga debido a que dentro de sus aspectos fisiológicos esta especie es de fácil adaptación y de rápido

crecimiento lo cual le confiere la facultad de propagarse en forma de maleza por su tendencia a colonizar sitios abiertos. Debido a las características expuestas la guayaba ha llegado a invadir bosques nativos en Hawái, Australia, Nueva Zelanda e incluso las Islas Galápagos en Ecuador (Cázares, et al., 2008).

Las utilidades de esta planta a nivel mundial consisten en plantaciones comerciales para la producción de frutos y el uso de su madera para carpintería o torneado, pero además sus hojas son utilizadas como colorante negro para la tinción de seda y algodón así como para la extracción de compuestos que resultan ser tóxicos para controlar plagas; de igual manera se utiliza tanto la hoja, flor, corteza, fruto y raíz por sus propiedades medicinales. Incluso esta especie es utilizada en sistemas agroforestales ya que se utilizan los árboles como barreras naturales de terreno y se plantan árboles dispersos con el fin de proveer sombra; como último punto, la guayaba ha sido considerada como una especie con potencial para la reforestación en zonas que han sido degradadas ya que áreas perturbadas facilitan la germinación y crecimiento de *P. guajava* (Kumari, et al., 2017).

1.2 Plantas invasoras

Es importante mencionar que la guayaba no se considera como una maleza pero sus características la han constituido como una especie de carácter invasivo, por lo que en muchas zonas del mundo se ha convertido en una planta invasora. En la actualidad muchas de las plantas invasoras, como es el caso de la guayaba, han sido introducidas con fines para la agricultura, horticultura y silvicultura. Estas introducciones se han dado de manera deliberada o accidental como consecuencia de la actividad humana generando una amplia cantidad de plantas alóctonas dispersas en varias partes del mundo. El problema de esta situación radica en que existe un considerable porcentaje de plantas que tras ser introducidas se han escapado de los cultivos

invadiendo el medio natural o los ecosistemas humanos. Esto ha producido consecuencias ecológicas y económicas perjudiciales dado que las plantas invasoras poseen un potencial para modificar el funcionamiento y estructura de los ecosistemas (Heywood & Brunel, 2010). Se considera por lo tanto que las especies invasoras son una de las mayores amenazas para la biodiversidad debido a que ocasionan la pérdida y degradación de hábitats (Jager, et al., 2009).

Se puede establecer por tanto ciertas características generales que las especies invasoras comparten como son la posibilidad de reproducirse y crecer de manera acelerada, la capacidad para colonizar terrenos que han sufrido alteración o baldíos, floración y diseminación temprana en conjunto con una alta producción de semillas, además de que tienen la capacidad de utilizar polinizadores y dispersores locales lo que les permite tener una dispersión efectiva, por último su crecimiento se ve favorecido por el hecho de que tengan la capacidad de reproducirse tanto sexual como asexualmente (Sakai, y otros, 2001).

1.3 Islas Galápagos y especies invasoras

Las Islas Galápagos poseen un alto número de especies endémicas debido a su aislamiento geográfico y a la confluencia de 3 principales corrientes marinas. Esto permitió la formación de nichos ecológicos únicos (Zahos & Habel, 2011). Sin embargo, esta biodiversidad se ve amenazada por la introducción de especies exóticas en las islas por actividades humanas. Una especie exótica es aquella que se encuentra en un lugar que no corresponde a su hábitat natural debido a que ha sido introducida por el hombre (Sax & Gaines, 2008). Cabe mencionar que los ecosistemas insulares son especialmente vulnerables a las especies introducidas debido a que el aislamiento geográfico de las islas ha impedido el desarrollo de mecanismos de defensa de especies endémicas posiblemente debido a la falta de depredadores . Por lo tanto, las especies nativas de islas no pueden defenderse frente a especies exóticas (Hall, 2018). Una especie exótica altera la

estructura del ecosistema llegando a desplazar o incluso a eliminar a otras especies dentro de un hábitat (Jagger, et al., 2009). Debido a esto las especies introducidas que se han convertido en invasoras representan la segunda razón para la pérdida de biodiversidad a nivel mundial. Por este motivo se ha establecido como prioridad establecer programas para la conservación de la biodiversidad existente en las islas (Itow, 2004).

Actualmente en el Archipiélago existen 1400 especies de animales y plantas exóticas que amenazan con destruir comunidades biológicas únicas, siendo una de ellas *Psidium guajava* (Dirección del Parque Nacional Galápagos, 2016). Esta especie fue introducida con fines de horticultura por los migrantes de las Islas Galápagos alrededor del siglo XIX ya que la agricultura consistía en una de las principales actividades de los colonos en las Islas Galápagos (Granda & Choéz, 2013). Debido a las características invasivas que posee esta especie comenzó a dispersarse volviéndose difícil de controlar incluso en terrenos de uso agrícola (Porter, 1969). A partir del siglo XX el turismo se convirtió en la primera fuente económica de las islas por lo que muchos terrenos previamente dedicados a la agricultura fueron abandonados proveyendo el escenario ideal para el crecimiento y difusión de esta especie de manera acelerada (Porter, 1969).

El carácter invasivo que posee la guayaba dio como lugar a su propagación descontrolada alterando diferentes ecosistemas dado que por competencia directa desplazó a la flora nativa (Magee, et al., 2001). Por lo tanto, la propagación descontrolada de la guayaba en las islas alterando diferentes ecosistemas sobre todo en cuanto a la vegetación dado que por competencia directa tiende a desplazar a la flora nativa (Magee, et al., 2001). Una de las especies más afectadas por la propagación descontrolada de la guayaba es el guayabillo (*Psidium galapageium*) (Ponce, 2016). El guayabillo es una especie endémica de las islas que comparte el mismo género que la guayaba por lo que la convivencia de estas dos especies coloca en grave peligro de extinción al

guayabillo dado que existe el riesgo de formación de híbridos entre ambas especies que podría resultar en la pérdida definitiva del guayabillo (Randell, et al., 2004).

1.4 Importancia de la diversidad genética en planes de control para la erradicación de plantas invasoras

Es importante destacar el hecho de que cuando se da la introducción de una especie en un nuevo hábitat, ya sea por medios naturales o por actividades antropogénicas, se da lo que conoce como efecto fundador (Trujillo, et al., 2013). El efecto fundador establece que solo un pequeño porcentaje de la población parental va a encontrarse representado en el nuevo ecosistema. Es decir, va a existir una menor diversidad genética de la nueva población en comparación con la población ancestral (Trujillo, et al., 2013). Esta diversidad genética reducida puede relacionarse con una menor capacidad de adaptación a cambios ambientales o a la respuesta frente a enfermedades o plagas (Lee, 2002). Entonces, el tamaño de la población fundadora va a determinar el pool genético inicial de la población madre en la isla; sin embargo, otras condiciones van a influir en el fitness de las especies introducidas ya que aquellas especies que poseen capacidades de dispersión eficientes, plasticidad fenotípica junto con otras características de especies invasoras van a poseer una mayor probabilidad de adaptabilidad al nuevo ambiente garantizando así su éxito (Lee, 2002).

La diversidad genética se puede definir como la variabilidad existente en los alelos de los genes dentro de una población y entre poblaciones, permitiendo obtener información acerca de diferentes indicadores de diversidad genética como son la heterocigosidad, número de alelos y estructura poblacional (Reed & Frankham, 2003). Por lo tanto, llegar a conocer la diversidad genética de *P. guajava* tanto en las Islas Galápagos como en Ecuador continental nos puede indicar la capacidad de adaptación y de respuesta frente a cambios ambientales o factores de estrés como enfermedades que posee la especie en estudio (Lawesson & Ortiz, 1990). Además, un

análisis genético de las poblaciones de guayaba en Ecuador continental puede ayudar a establecer el origen de esta especie en Galápagos permitiendo conocer la historia de invasión de esta especie para poder entender su dinámica de expansión. A partir de esa información se pueden realizar programas para el control del crecimiento y difusión de *P. guajava* en las Islas Galápagos con el fin de conservar a las especies endémicas (Reed & Frankham, 2003).

1.5 Marcadores moleculares

La diversidad genética se puede determinar mediante el uso de marcadores moleculares. Los marcadores moleculares son secuencias en el genoma que se caracterizan por ser polimórficas, por lo que estos polimorfismos permiten identificar la variación existente entre individuos que pertenecen a una población o incluso entre especies (Varshney, et al., 2005). De manera específica, los marcadores microsatélites (SSRs) son segmentos de ADN que pueden variar de 1 a 6 pares de bases que en el genoma se repiten en tándem y de manera aleatoria (Varshney, et al., 2005). Además, los microsatélites se caracterizan por tener un alto grado de polimorfismo, cubren una gran extensión del genoma, son codominantes, no se requiere de altas cantidades de ADN para realizar los diferentes análisis y se encuentran en todos los organismos eucariotas (Coser, et al., 2012). Las desventajas de utilizar marcadores microsatélites consisten en que se debe diseñar primers que flanqueen las regiones de interés para lo cual es necesario el conocimiento del genoma de la especie en estudio pero existe ya una gran cantidad de información disponible acerca de los genomas de una gran cantidad de organismos en bases de datos e incluso investigaciones donde se diseñan y se estandarizan primers para determinadas especies (Aranguren-Méndez, et al., 2005). Este es el caso de *Psidium guajava*, que debido a su importancia en la agricultura de varios países, existe una gran cantidad de publicaciones sobre primers para amplificar regiones microsatélites de carácter polimórfico (Guavamp, 2008).

En base a esto, en este trabajo se determina la diversidad genética de la guayaba en Ecuador continental utilizando 13 marcadores microsatélites de *P. guajava* que fueron descritos por Risterucci y colaboradores en 2005; además, se busca establecer el origen de la guayaba introducida en las Islas Galápagos ya que el conocer acerca de la historia y procesos de invasión de una especie se puede establecer los efectos que tiene esta especie sobre el ecosistema. (Reed y Frankham, 2003).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Determinar la diversidad genética de *Psidium guajava* en Ecuador continental mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites.

2.2 Objetivos específicos

- Amplificación de 13 marcadores moleculares microsatélites específicos para *Psidium guajava* con una cola universal y que se encuentren marcados con fluoróforo para el posterior análisis de genotipado.
- Determinar la diversidad genética de *Psidium guajava* en Ecuador continental
- Analizar la estructura poblacional de *Psidium guajava* en Ecuador continental
- Comparar la diversidad genética de la población de *Psidium guajava* en Ecuador continental con los valores de diversidad de poblaciones de las Islas Galápagos.
- Establecer la procedencia de *Psidium guajava* de Ecuador continental en Galápagos.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies introducidas se definen como aquellas cuya distribución geográfica natural no corresponde a la zona en la que se encuentran debido a la introducción de estas especies por actividades humanas. Esta introducción de especies foráneas en un ecosistema atenta contra la estabilidad del mismo pudiendo incluso llegar a desplazar a las poblaciones locales silvestres (Itow, 2003). Un problema ampliamente conocido es la introducción de especies vegetales en el Archipiélago de Galápagos, siendo una de estas especies *Psidium guajava*, cuyo nombre común es guayaba. La guayaba fue introducida alrededor de 1850 para la siembra y obtención del fruto, además de como alimento de ganado desde Ecuador continental. Desde entonces esta especie debido a su capacidad invasiva se ha extendido a un gran número de zonas de las Islas Galápagos (Wash, et al., 2007). Por otro lado, en Galápagos existe la especie endémica guayabillo (*Psidium galapageium*), el cual ha sido reportado en varias islas del archipiélago pero no se conoce con exactitud su densidad y distribución poblacional (Véliz, 2015). Se cree que la invasión de la guayaba ha puesto en peligro al guayabillo debido a la alteración de procesos ecosistémicos que pueden llegar a desplazar a la especie endémica. Además, existe la posibilidad de eventos de hibridación entre la guayaba y el guayabillo (Jagger, et al., 2009)

Es de vital importancia la conservación de la biodiversidad existente en las Islas Galápagos, por lo que la determinación de la diversidad genética de la guayaba en Ecuador continental puede ayudar a esclarecer el origen de la guayaba en las Islas Galápagos . Los análisis a nivel genético permiten entender la historia de invasión de una especie, es decir su dinámica de expansión geográfica de tal manera que se pueda tomar medidas para controlar su dispersión. (Reed y Frankham, 2003).

4. ÁREA DE ESTUDIO

Para este estudio se muestreó individuos de *P. guajava* distribuidos en toda la extensión territorial de Ecuador continental. Este muestreo se realizó en 19 provincias del continente, recolectando 171 individuos de *P. guajava*. El método de muestreo consistió en la recolección de hojas jóvenes de árboles de guayaba siendo este tejido vegetal almacenado en fundas Ziploc correctamente rotuladas con la información del nombre del individuo y la localidad de recolección. En el interior de las fundas se colocó silica gel para el secado de las muestras. Posteriormente, los individuos de *P. guajava* recolectados fueron llevados al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, donde se realizó la extracción y amplificación del ADN y los posteriores análisis de diversidad genética y estructura poblacional.

5. MATERIALES

5.1 Recolección material vegetal

- Hojas jóvenes de la especie *P. guajava* recolectados en Ecuador continental
- GPS
- Cuaderno de campo
- Fundas Ziploc
- Silica gel

5.2 Extracción de ADN genómico

- Hojas de guayaba de los individuos recolectados
- Mortero y pistilo
- Nitrógeno líquido
- Buffer de extracción CTAB 2X
- 2, β -mercaptoetanol de Bio-Rad
- Isopropanol 100%
- Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
- Cama de arena Multi Block Heater de Thermo Scientific
- Etanol 70%
- Ultra Pure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)

5.3 Análisis del ADN genómico extraído

- ADN de los individuos recolectados de guayaba
- UltraPure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)
- NanoDrop

5.4 Amplificación de regiones microsatélite

- Tubos Eppendorf de 1.5 mL
- Tubos Eppendorf de 0.2 mL
- Taq platinum ADN polimerasa 5U/ μ l de Invitrogen
- Buffer de PCR 10x de Invitrogen
- Ultra Pure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)
- 13 pares de primers SSRs (Tabla 1)

5.5 Electroforesis en gel 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 de C.B.S Scientific)
- Tris – Ácido Bórico – EDTA (TBE) 1X
- Blue Juice 10X Loading Buffer de Invitrogen
- Ladder 100bp de Invitrogen

5.6 Genotipado

- Placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate de Applied Biosystems®
- 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems®
- Software GeneMarker® de SoftGenetics

5.7 Análisis estadístico

- Software R y RStudio
- Programa STRUCTURE
- Software CLUMPP 1.1.2
- Software DISTRUCT 1.1
- Software DIYABC 2.1.0
- Microsoft Excel
- Adobe Illustrator

6 MÉTODOS

6.1 Recolección de muestras de *Psidium guajava* en Ecuador continental

En mayo y junio del 2017 se realizaron varias salidas de campo para realizar el muestreo de *P. guajava* en 19 provincias del Ecuador continental (Tabla 2). Se recolectaron 171 individuos de *Psidium guajava* (Figura 1). En cada provincia se muestreó de 4 a 5 localidades y dentro de cada localidad se recolectaron individuos que se encontraban separados por una distancia mínima de 300 metros. (Anexo A).

Se recolectó entre 2 a 3 hojas jóvenes por individuo, las cuales se depositaron en fundas Ziploc que contenían silica gel. Las muestras se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal en la Universidad San Francisco de Quito donde se conservaron hasta su procesamiento.

6.2 Extracción y cuantificación de ADN de los individuos de *Psidium guajava*

Para la extracción del ADN del material recolectado se siguió el protocolo de Shagai-Marooft y colaboradores (1984) con ligeras modificaciones realizadas para aumentar la concentración del ADN genómico obtenido. En primer lugar, se pesaron 50mg material vegetal de cada muestra recolecta. Se colocó este material en un mortero previamente desinfectado con etanol al 70%, luego se añadió nitrógeno líquido en una cantidad suficiente que cubra el tejido vegetal y se procedió a la maceración del tejido vegetal con un pistilo. A esto se le añadió 800 μ l de detergente catiónico CTAB mezclando uniformemente y el producto resultante de este proceso se transfirió a tubos eppendorf de 1.5mL. Este detergente ayuda a la ruptura o disolución de las membranas celulares (Rocha, 2002). Luego, a cada uno de los tubos se les añadió 8 μ l de β -mercaptoetanol para la remoción de proteínas que puedan llegar a destruir el ADN o que afecten su calidad (Rocha, 2002).

Posteriormente se incubó a 62°C cada uno de los tubos en una cama de arena durante una hora pero realizando agitaciones cada 15 minutos. Luego, se añadió cloroformo-alcohol isoamílico en una proporción 24:1 y se dejó reposar por 20 min. Posteriormente se centrifugó cada muestra a 13200 rpm por 20 min. Tras el proceso de centrifugación, se extrajo el sobrenadante obteniendo un volumen aproximado de 500 µl y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf correctamente rotulado. Se agregó 600 µl de isopropanol frío, el cual se encontraba almacenado a 4°C y se puso en congelación durante 1 hora. A continuación, se invirtió cada tubo delicadamente y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min.

Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol al 70%, donde se trató de homogenizar el pellet con el etanol. Luego, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, se eliminó el etanol y se dejó secar el pellet. Como último paso, se resuspendió el ADN genómico con agua para PCR en una cantidad de 75 µl. Para la evaluación de la calidad e integridad del ADN genómico extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 2), y posteriormente para la cuantificación del ADN y análisis de pureza se utilizó el NanoDrop 1000 (Anexo B). Estas muestras fueron conservadas a -20°C.

6.3 Amplificación del ADN utilizando marcadores microsatélites

Se seleccionó las muestras que poseían una alta concentración y buena calidad de ADN. Entonces, de los 171 individuos de guayaba muestreados se escogieron 96, seleccionando por lo menos 4 individuos de cada una de las 19 provincias. De los individuos seleccionados, se realizó diluciones de su ADN a una concentración de 20 ng/ µl con agua de PCR.

Para el proceso de amplificación mediante PCR se utilizó 13 primers microsatélites de *P. guajava* que fueron descritos por Risterucci et al. (2005). En la Tabla 1 se muestran las secuencias

de cada uno de los primers utilizados. Por lo tanto, se utilizó el genotipado por fluorescencia descrito Blacket y colaboradores (2005), este método consiste en un sistema de tres primers: un primer *forward* universal marcado con fluoróforo, un primer *forward* que es específico pero posee en el extremo 5' una secuencia complementaria al primer universal, y finalmente un primer *reverse* específico. Durante la reacción de PCR, el primer *forward* específico se agota al encontrarse en menor concentración que el resto de primers, esto da lugar a que el primer universal marcado con fluoróforo se una a la secuencia complementaria del primer *forward* específico (Blacket, et al., 2005).

Se realizó una estandarización inicial de todos los primers a ser utilizados con 6 muestras de las 96 seleccionadas para evaluar que las condiciones de PCR reportadas por Urquía (2017) y Espín (2017) funcionen y amplifiquen correctamente. Para la elaboración del master mix de cada reacción se añadió 20.55 µl de Agua de PCR, 3 µl de buffer de PCR 10X con una concentración final de 1X, 1.5 µl de MgCl₂ 50mM con una concentración final de 2mM, 0.6 µl de dNTPS 10mM con una concentración final de 0.2mM, 1.5 µl del primer *forward* modificado con la cola universal, 0.6 µl del primer *reverse*, 1.5 µl del primer marcado con fluoróforo (6FAM, VIC, NED o PET), 0,2 µl Taq Polimerasa Platinum utilizando 1U por reacción y 2 µl de ADN de cada individuo previamente diluido a 20 ng/ µl que es equivalente a 100 ng de ADN por reacción. Es importante mencionar que a cada set de primers se les asignó un fluoróforo distinto VIC, NED, 6FAM o PET (Tabla 3).

Para el proceso de reacción en cadena de la polimerasa o PCR se utilizó el programa de ciclado reportado en el proyecto de investigación de Diego Urquía (2018), el cual consiste en los siguientes pasos: 1) Denaturación inicial durante 15 minutos a 95°C. 2) Denaturación durante 30 seg a 94°C. 3) Hibridación durante 1min 30 seg con una temperatura que varía de acuerdo al set

de primers a ser utilizados (Tabla 3). 4) Elongación durante 1 min a 72°C, y 5) Elongación final durante 5 minutos a 72°C. El número de ciclos que se realizaron variaron de 30 a 35 ciclos dependiendo del primer a ser utilizado (Tabla 3). La amplificación de los loci mediante el proceso de PCR se confirmó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 3). Las condiciones de la electroforesis es 80V durante 35 minutos. Los amplicones resultantes se conservaron en congelación.

6.4 Determinación del genotipo de los individuos de *P. guajava*

Los productos de PCR fueron transferidos a los pocillos de las placas MicroAMP Optical, en donde cada pocillo debía contener un volumen total de 40 µl, para lo cual se agregó de 3 a 4 reacciones realizadas con diferentes fluoróforos.

Las placas llenas fueron enviadas a Macrogen en Corea del Sur, para su genotipado. Para ello, se utilizó el secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. Este proceso se realiza utilizando electroforesis capilar, que permite determinar el genotipo de cada individuo para cada locus analizado. Macrogen envió los archivos de los resultados obtenidos en formato .fsa, y estos archivos fueron analizados utilizando el programa GenMarker. Para poder determinar aquellos picos que representaban alelos verdaderos se utilizó el protocolo de Luckau (2013). Con los alelos identificados de cada uno de los individuos se elaboró una matriz que indica los alelos de cada locus analizado, el individuo y la población a la que correspondía el individuo.

6.5 Análisis de datos

Todos los loci analizados demostraron ser polimórficos por lo que se mantuvieron todos los loci para el análisis a excepción de mPgCIR26 que fue eliminado debido a que se presentaron problemas al momento de la amplificación. Además, previo al análisis de los datos se agruparon

a de los individuos de *Psidium guajava* muestreados, con el fin de poder realizar un análisis a escala más global. Se evitó realizar agrupaciones basándose en límites geográficos de provincia ya que se considera que la genética de una población no se ve influenciada por estas delimitaciones geopolíticas. Por este motivo se dividió al país en las tres regiones geográficas que dividen a Ecuador continental, siendo estas regiones Costa, Sierra y Amazonía ya que la separación las regiones mencionadas se encuentra dada por la cordillera de los Andes que representa una barrera natural. Además, se dividió de manera latitudinal al Ecuador por lo que se midió la extensión del Ecuador desde el punto más nórdico hasta el punto más al sur del país, en donde se estableció que la distancia entre los puntos definidos es de 720km (Figura 4). En base a este valor se definió las zonas norte, centro y sur, cada zona con una extensión de 240km. Finalmente, tomando en cuenta lo establecido se agruparon a los individuos en 9 regiones dependiendo de su ubicación regional y latitudinal. Con las 9 regiones definidas en Ecuador continental se creó una matriz para el análisis de los datos genéticos. Posteriormente, se creó otra matriz que contenía las 9 regiones establecidas de Ecuador continental y las tres islas de Galápagos: Santa Cruz, Isabela y San Cristóbal.

Para poder utilizar el programa R, se transformó las dos matrices previamente mencionadas: Una que contiene solo a los individuos de Ecuador continental y otra que contenga a los individuos de Ecuador continental y a las tres Islas de Galápagos en base al formato establecido en una guía para R (Trevor, 2015). Estos archivos se guardaron en formato de texto, que posee la extensión .txt. Utilizando la función `df2gening` del paquete de RStudio `adegenet` se transformó cada una de las matrices a formato `genind`, con lo cual se obtuvo el número de alelos por locus, número de alelos totales, heterocigosidad observada y esperada por locus. Para la obtención de estos índices por región, se transformó a formato `genpop` utilizando el comando `genind2genpop` con el mismo paquete previamente mencionado, pero para este caso el comando

se utiliza para la obtención de número de alelos por localidad mientras que se debe utilizar la función Hs, estableciendo la condición pop=TRUE para la obtención de la heterocigosidad esperada.

6.6 Estructura poblacional

Con las matrices que se mencionan en el párrafo anterior se calculó las distancias genéticas de Nei utilizando el comando dist tanto por individuos como por poblaciones. Las distancias genéticas entre poblaciones se calcula en base a los promedios de todos los individuos que constituyen una determinada población, y estas distancias genéticas entre las poblaciones fue utilizada para la elaboración del dendograma Neighbor joining, en el cual la distancia genética entre cada región analizada se ve representada por la longitud de la rama (Demarchi, 2009). Por otro lado, en base a la matriz resultante de las distancias genéticas entre individuos se elaboró un Análisis de Componentes Principales (PCoA), uno considerando únicamente a Ecuador continental y otro que incluye a Ecuador continental y a las Islas Galápagos.

Se realizó de igual manera un análisis de STRUCTURE con el fin de poder establecer el número de linajes existentes y como estos se encuentran definidos en la estructura poblacional en base a análisis estadísticos bayesianos. Para este análisis se utilizó el software STRUCTURE para lo cual se modificó la matriz en base al formato establecido en la guía de uso. En este caso, se utilizó las regiones establecidas en esta investigación. En primer lugar, se realizó una corrida de prueba preliminar utilizando el modelo Admixture y como prior las regiones a las que pertenecen cada individuo. Esta corrida permitió establecer el número posible de linajes existentes para lo cual en el caso de Ecuador continental se asumió de 1 a 11 posibles grupos ancestrales (K), ya que se recomienda utilizar un valor K en el cual al valor esperado de linajes se le agregue dos. Se utilizó un MCMC (Markov Chain Monte Carlo) de 100000 y un burning period de 10 000,

estableciendo un número de 10 réplicas, esto se recomienda en la literatura ya que permite obtener resultados robustos y confiables. Para poder evaluar si existe una correlación entre distancias genéticas y geográficas se realizó una prueba de Mantel utilizando el programa GenAlex.

Con esta información se realizó otra corrida en el cual solo se redefinió los valores de linajes a ser analizados de 1 a 6, y se utilizó un MCMC de 2×10^6 y un burning period de 1×10^6 con 10 réplicas. Se utilizó el mismo set de condiciones para analizar el número de linajes en Ecuador continental con las Islas Galápagos, y se evaluó un K de 1 a 7, se definió este rango debido a que se tomó en cuenta los 3 linajes que presentó Ecuador continental y se esperó que en las Islas Galápagos se presenten dos linajes diferentes en base a un estudio realizado por Urquía, et al (2019), en el cual se investiga la estructura poblacional con las mismas islas analizadas en este estudio. Los resultados de STRUCTURE Harvester se extrajeron para obtener las gráficas generalizadas del K más óptimo a través del uso de CLUMPP que es un programar que resume todas las iteraciones realizadas y se complementa con el programa DISTRUCT que genera los gráficos finales.

6.7 Modelos de introducción de *P. guajava* en las Islas Galápagos

Para poder determinar los patrones de introducción de guayaba en las Islas Galápagos se realizó un análisis llamado Approximate Bayesian Computations (ABC) que permite analizar mediante inferencia bayesiana distintos escenarios. Esto se realizó utilizando el software DIYABC el cual necesita que la matriz se encuentre en formato genepop ya que realiza el análisis en base a las poblaciones. Para un primer análisis se clasificó a los individuos del continente en base a los 3 linajes que se observaron en los resultados de STRUCTURE dado que de esta manera se puede determinar el linaje de origen de Ecuador continental en la región insular. Por lo tanto, en DIYABC se establecieron 3 escenarios diferentes en base a la información obtenida de STRUCTURE para

Ecuador continental. Es decir para esclarecer el origen de la guayaba del continente a Galápagos se realizaron escenarios utilizando como base los 3 linajes de la muestra de guayaba analizada en Ecuador continental en donde cada linaje va a representar a una población mientras que los individuos de guayaba de Galápagos se agruparon como otra población. Por tanto, cada escenario evaluará la probabilidad de ocurrencia de introducción de cada uno de los linajes en las Islas Galápagos (Figura 5).

El escenario que posee más probabilidad de ocurrencia va a sugerir cuál de los linajes analizados fue introducido a Galápagos. A partir de estos resultados, se plantearon cuatro escenarios para poder entender el patrón de introducción de la guayaba a las Islas Galápagos. Por lo tanto, a partir del linaje con mayor probabilidad de ocurrencia de haber dado origen a la población de guayaba en la región insular del Ecuador se evaluó si se dio una o más introducciones de guayaba a las Islas Galápagos. La primera posibilidad consiste en la hipótesis de que se dio únicamente una introducción, por lo que se evalúa si el primer proceso de colonización de guayaba fue en San Cristóbal y de esta isla desciende a Isabela siendo este el primer escenario, o si la primera introducción fue en Isabela seguido de una descendencia de la población de *Psidium guajava* a San Cristóbal (Figura 6a y 6b). La segunda hipótesis sugerida analiza dos introducciones de la guayaba a las Islas Galápagos para lo cual se modelaron dos escenarios. El primer escenario establece que se dio una primera introducción en San Cristóbal seguido de una segunda introducción en Isabela, mientras que el segundo escenario plantea la posibilidad de que la primera introducción se haya dado en Isabela y que luego se dé una segunda introducción en San Cristóbal. Cabe mencionar que en todos los 4 escenarios establecidos se asume que Santa Cruz es una población resultante de la mezcla entre San Cristóbal e Isabela (Figura 6c y 6d).

7 RESULTADOS

7.1 Extracción y cuantificación de ADN de los individuos de *Psidium guajava*

Se realizó una extracción exitosa de ADN de los 96 individuos de *P. guajava* de Ecuador continental. De manera general se puede decir que se extrajeron concentraciones de ADN que variaban en un rango desde los 300 ng/μl hasta los 4000 ng/μl; sin embargo, cabe mencionar que existieron 2 muestras que presentaron concentraciones menores a 200 ng/μl. Además, la evaluación de la calidad del ADN mediante espectrofotometría indicaron niveles óptimos del ratio de absorbancia $A_{260/230}$ pues estos valores se encontraban muy cercanos a 2.0. Por otro lado los resultados del ratio de $A_{260/280}$ poseían valores menores que 1.8, que es considerado como el valor óptimo, lo que puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos o proteínas (Desjardins & Conklin, 2010). Los valores de cuantificación del ADN se pueden observar en el Anexo B. Por último, utilizando la técnica de electroforesis en gel agarosa se observó bandas de ADN claras sin degradación y con el tamaño esperado permitiendo comprobar la calidad e integridad del ADN (Figura 2).

7.2 Amplificación del ADN utilizando marcadores microsatélites

Se logró una amplificación exitosa con 12 de los 13 pares de primers utilizados. El primer mgCIR26 se eliminó debido a que presentó problemas de amplificación; el resto de los loci microsatélites amplificaron exitosamente con las condiciones de PCR previamente estandarizadas y que se mencionan en la sección de metodología.

7.3 Determinación del genotipo de los individuos de *P. guajava*

Los 96 individuos de *Psidium guajava* fueron exitosamente genotipados. Todos los loci microsatélite utilizados demostraron ser polimórficos. Se encontró un total de 151 alelos para la población analizada, observándose un promedio de 12.58 alelos para los 12 loci analizados. Los loci que presentaron mayor cantidad de alelos fueron: mPgCIR10 con 24 alelos, mPgCIR05 con 22 alelos y CIR17 con 16 alelos. El resto de loci poseen alelos en un rango de 6 a 13, siendo mPgCIR11 el que reporta menor cantidad de alelos (Figura 7). Por otro lado, todos los loci analizados presentaron una heterocigosidad esperada promedio de 0.82 versus una heterocigosidad observada promedio de 0.31 (Tabla 4).

Al analizar el número de alelos presentes en cada una de las 9 regiones previamente establecidas, se puede observar que todos los grupos tienen un número variable de alelos observados ya que varía en un rango de 40 a 71, siendo las regiones Costa y Sierra norte las que poseen la menor cantidad de alelos (N=4), mientras que la región con mayor número de alelos es Amazonía Sur (N=14). Es importante mencionar que el número de muestras por región no varía ya que todas los grupos poseen un número muestral de 9 a 13 individuos. Es importante mencionar que las regiones analizadas presentan por lo menos 4 alelos privados (Tabla 5).

7.4 Análisis de índices de diversidad genética

Los primeros indicadores por analizar corresponden a la heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o). De manera global se obtuvo que H_e es de 0.69, mientras que la H_o es igual a 0.27 por lo que se establece que la heterocigosidad esperada es significativamente mayor que la heterocigosidad observada, este mismo patrón puede ser observado al momento de analizar heterocigosidades por región (Tabla 5). Las H_o más altas observadas corresponden a la

región Amazonía centro con un valor de 0.41 y Amazonía norte con 0.43, mientras que aquellas que presentaron los valores más bajos fueron las regiones Costa Norte con 0.09 y Costa Centro con 0.17. Por otro lado, He más altas corresponden a Costa Sur y Sierra Sur con valores de 0.72 y 0.70, respectivamente, mientras que la He más baja es Costa Norte con 0.5, el resto de regiones poseen heterocigosidades esperadas alrededor de 0.6 (Tabla 5). Finalmente, los análisis de endogamia para la población de Ecuador continental reportan un Fis global igual a 0.61. Además se puede observar en la Figura 8 que existe un alto número de individuos de *P. guajava* con coeficientes de endogamia que varían en un rango de 0.6 a 0.8.

7.5 Estructura poblacional

Se elaboró un PCoA en base a las distancias genéticas entre los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental en el cual se observa que no existe algún tipo de agrupación, es decir que ninguna de las 9 regiones analizadas se separa claramente ya que todos los individuos se encuentran dispersos espacialmente sin seguir un patrón específico como se puede observar en la Figura 9. Por otro lado, en el PCoA que incluye a los individuos de Ecuador continental, San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela si se distingue agrupamientos de acuerdo al origen de los individuos, es decir se observa un agrupamiento por isla y por continente (Figura 10). Los individuos de *P. guajava* del continente se encuentran más alejados de aquellos individuos que provienen de las islas, esto demuestra la diferenciación genética existente entre los individuos de la guayaba del continente versus los del archipiélago Galápagos. Además, cabe mencionar que existen ciertos individuos del continente que se ubican en el medio entre el grupo del continente y las Islas Galápagos.

Para el dendograma Neighbor joining se utilizaron las distancias genéticas de Nei, por esta razón la longitud de las ramas representa la distancia genética existente entre cada población

(Demarchi, 2009). En el Neighbor joining de Ecuador continental Figura 11a, se observa una agrupación de orden latitudinal, ya que las diferentes poblaciones se relacionan unas con otras por su ubicación en norte, centro o sur. Por lo tanto, Costa norte, Sierra norte y Amazonía norte se encuentran agrupadas y poseen distancias genéticas similares unas con otras; sin embargo, la población de Amazonía Centro se encuentra más relacionada con Amazonía Norte que con las poblaciones de la zona centro del Ecuador que corresponde a Sierra centro y Costa centro, las cuales si se encuentran altamente relacionadas, es decir cercanas genéticamente. Por otro lado, las regiones Costa y Sierra sur poseen distancias genéticas bajas entre sí pero la región Amazonía sur se encuentra genéticamente alejada de estas regiones.

Por otro lado, al analizar el Neighbor joining que incluye a los individuos *P. guajava* de Ecuador Continental y de las islas Santa Cruz, Isabela y San Cristóbal (Figura 11b) se visualiza lo previamente establecido en el PCoA de que las Islas Galápagos se encuentra diferenciada genéticamente de la población de Ecuador Continental formando un agrupación separada de los individuos del continente. Sin embargo, a pesar de las distancias genéticas entre continente e islas se destaca el hecho de que la isla San Cristóbal se relaciona con la población Sierra centro de Ecuador continental, lo que significa que existe una similitud genética entre estos grupos de individuos.

Al analizar el resultado de STRUCTURE considerando únicamente a los individuos *P. guajava* de Ecuador continental (Figura 12a), se estableció que el número más probable de linajes en base a un ΔK de 84.13 fue de 3, en el cual se observa que no existe estructura poblacional definida pero si la predominancia de linajes de acuerdo a la zonas latitudinales establecidas ya que la región norte del país se encuentra dominada en este caso por el linaje representado por el color rojo, la región centro por el linaje que corresponde al color verde, mientras que la zona sur del país

posee una mezcla de los tres linajes mencionados con una predominancia del linaje verde. Además, es importante mencionar que los individuos que pertenecen al linaje amarillo tienen un acervo genético significativamente más que pequeño que los otros dos linajes, por lo que se decidió incluir el gráfico de STRUCTURE que posee un K de 2 para poder evaluar como los individuos de este linaje se relacionan o se agrupan con los otros linajes. Como se evidencia en la Figura 12b los linajes rojo y verde pasan a formar parte de un solo grupo mientras que los otros individuos del linaje amarillo se agrupan en otro, indicando la diferenciación genética existente entre los individuos del linaje amarillo versus los otros individuos.

Debido a que no se observó una estructura poblacional definida de la muestra de *Psidium guajava* analizada en Ecuador continental pero si predominancia de linajes de acuerdo a las zonas latitudinales establecidas se realizó una prueba de Mantel (Figura 13). Los resultados de este análisis revelaron que no existen una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de los individuos de *P. guajava* dado que con un valor P de 0.120 no se rechaza la hipótesis nula la cual establece que no existe una correlación entre las distancias geográficas y genéticas.

Por otro lado, el STRUCTURE que involucra a las poblaciones de Ecuador continental, Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal dio como resultado un K óptimo de 2 con un ΔK igual a 737.29 (Figura 14a). En este caso se observa una estructura genética para Ecuador continental que representa un grupo y las Islas Galápagos que conforman otro grupo. Sin embargo, a pesar de la clara diferenciación entre estos grupos se puede observar que existe la presencia del grupo del continente en Galápagos, así como la existencia del grupo de Galápagos en el continente con una predominancia en las zonas Centro y Sur del Ecuador. Esto ratifica la relación que existe entre Ecuador continental y la región insular a pesar de que sean poblaciones lejanas genéticamente.

Adicional a esto, en la Figura 14b que indica un K igual a 3 se evidencia como Santa Cruz posee una mezcla significativa de los linajes presentes en San Cristóbal e Isabela.

7.6 Evaluación de patrones de introducción

Los resultados del análisis del ABC para evaluar la procedencia de la población de *P. guajava* en el Archipiélago de Galápagos estableció que el escenario 2 (Figura 5b) que establece que la población de *P. guajava* en las Islas Galápagos proviene del linaje verde mostrado en STRUCTURE, fue el que explicaba mejor el proceso de introducción en base a la probabilidad posterior de 0.34 del cálculo directo y de 0.44 de la regresión logística. Los otros escenarios fueron descartados dado que presentaban probabilidades posteriores de regresión logística de 0.37 y 0.18 para el escenario 1 y 3, respectivamente. Por otro lado, para el análisis del número de introducciones de la guayaba en la región insular, el escenario 2 (Figura 6b), el cual establece que existió un único proceso de introducción que fue de Ecuador continental a la Isla San Cristóbal, posee la probabilidad posterior 0.42 y de 0.56 para el método directo y de regresión, respectivamente. El escenario 1 posee una probabilidad posterior de 0.43 utilizando la regresión logística, mientras que los escenarios 3 y 4 dieron como resultado una probabilidad posterior de 0, por lo que se descartaron estos 3 escenarios.

8 DISCUSIÓN

8.1 Diversidad genética

En base a los resultados obtenidos se establece que la población de *Psidium guajava* de Ecuador continental posee una diversidad genética alta en comparación a las Islas Galápagos. Esto se fundamenta debido a que la heterocigosidad es la variación genética de una población analizada (Gutiérrez, 2009). Por lo tanto para este estudio la H_e esperada global en Ecuador continental es de 0.7, lo cual es significativamente más alto que la heterocigosidad esperada reportada en las Islas Galápagos en donde se obtuvo un valor de H_e igual a 0.356 (Urquía, et al., 2019) . Estas diferencias en la heterocigosidad se relacionan con el hecho de que la población de Ecuador continental analizada posee 151 alelos con los 11 loci analizados, mientras que para las Islas Galápagos se reporta un total de 52 alelos. (Urquía, et al., 2019). (Morillo, et al., 2011).

Además, se debe mencionar que en el estudio realizado en Galápagos de los 13 loci microsatélites analizados únicamente 9 fueron polimórficos mientras que en Ecuador continental los 11 loci utilizados resultaron ser polimórficos, esto se debe a que aquellos loci que son monomórficos en las poblaciones de las Islas Galápagos, en Ecuador continental si presentaron un número de alelos mayor a uno. (Teulat, et al., 2000). Por lo tanto, estos resultados son los esperados debido a que el proceso de colonización de *P. guajava* en las Islas Galápagos se asocia con principio del efecto fundador, este principio se relaciona con cuellos de botellas dado que solo un porcentaje bajo de la diversidad genética de la población madre se ve representada en el sitio de colonización y de manera progresiva con el paso del tiempo la nueva población se va diferenciando. Es importante mencionar que se asume que Ecuador continental es la población fundadora de la guayaba en las Islas Galápagos en base a la historia de colonización de las islas que produjo un constante flujo migratorio humano junto con la introducción en las islas de

productos agrícolas, además de que se observa alto número de alelos compartidos entre las poblaciones de guayaba de Ecuador continental y la región insular. Por este motivo el sitio de colonización, en este caso Galápagos, va a tener una diversidad genética significativamente menor que la población fundadora, que en este caso se asume que es Ecuador continente (Prentis, et al., 2008).

En base a lo analizado, se puede llegar a establecer finalmente que las poblaciones de guayaba de San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela presentan una diversidad genética inferior a la encontrada en Ecuador continental, concordando con lo esperado en base a la literatura dado que las poblaciones introducidas poseen una variación genética menor debido a que constituyen un subconjunto de una población más grande en base al principio del efecto fundador y a la alta frecuencia de reproducción de manera asexual (Allendorf & Lundquist, 2003).

Los resultados indican que la H_o global que presenta la población de *Psidium guajava* de Ecuador continental es igual a 0.27 con un coeficiente de endogamia (F_{is}) de 0.61. Esto concuerda con otros estudios de diversidad genética de *P. guajava* en los cuales se han mostrado coeficientes de endogamia significativamente altos. Tal es el caso de Estados Unidos en donde se evaluaron cultivares autóctonos tanto de ese país como de otros países y en este estudio se reportó una H_o de 0.2 y un valor F_{is} de 0.8 (Sitther, et al., 2014). Estos altos valores en el coeficiente de endogamia obtenidos al analizar poblaciones de *P. guajava* son explicados por la tendencia de esta especie a autopolinizarse y a reproducirse clonalmente con una frecuencia de aproximadamente un 60% (Sitther, et al., 2014). La autopolinización produce una reducción significativa del número de heterocigotos en la población ocasionando pérdida en la variabilidad genética de una población y por ende una pérdida en la capacidad de adaptación (Sitther, et al., 2014). (Figura 14) (Sitther, et al., 2014).

Además, en otros estudios se ha podido establecer que la baja heterocigosidad observada se debe específicamente al factor de autopolinización que caracteriza a esta especie ya que en un estudio realizado por Valdés-Infante y colaboradores (2007) se indujo mecanismos de autocompatibilidad en *P. guajava*. Esto permitió determinar que la eliminación de la autopolinización en esta especie tiene un rol importante en el aumento de la diversidad genética dado que se alcanzó una heterocigosidad observada promedio de todos los loci microsatélites analizados de 0.38, que es alto al compararlo con el grupo control que presentó una H_o promedio igual a 0.2 (Valdés-Infante, et al., 2007).

Sin embargo, esta característica de la guayaba de poder reproducirse tanto sexual como asexualmente, le confiere una gran cantidad de ventajas al momento de expandirse en nuevos territorios (Sittther, et al., 2014). Por lo tanto, cuando la naturaleza de una especie tiende hacia la endogamia va a tener la facilidad de expandirse espacialmente ya que puede propagarse en ausencia de otras plantas de su especie o de agentes polinizadores lo que resulta beneficioso para una especie introducida. Por este motivo es que una planta con esta capacidad de autofecundación tiende a volverse invasora (Frankham, 2005).

Finalmente, se debe analizar porque existe tanta diferencia entre la H_e y la H_o de la muestra poblacional de guayaba de Ecuador continental. Para esto se debe mencionar que la H_e se calcula con las frecuencias alélicas de la muestra poblacional analizada del número total de alelos encontrados, tomando como base que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg. Es decir, la heterocigosidad esperada va a revelar la riqueza alélica que existe en la población asumiendo que existe panmixia o apareamiento aleatorio en la guayaba. Pero la guayaba al ser una especie que se reproduce en un alto porcentaje por endogamia va a producir una desviación de las

frecuencias genotípicas esperadas por Hardy-Weinberg, dando como resultado una tendencia hacia la homocigosidad.

8.2 Estructura poblacional de los individuos de *Psidium guajava* en Ecuador continental

En cuanto a los resultados de STRUCTURE con un $K=3$ se puede observar que existe una mezcla entre los linajes presentes por lo que no existe una estructura poblacional definida a pesar de que si se puede evidenciar predominancia de los linajes en las zonas geográficas norte, centro y sur del país (Figura 11a). Esta mezcla entre linajes se sustenta con el coeficiente global F_{st} el cual establece la diferenciación genética existente entre poblaciones ya que en la población de guayaba analizada en Ecuador continental el F_{st} fue igual 0.08 (Tabla 7). Este coeficiente indica que los individuos de *Psidium guajava* de Ecuador continental se encuentran genéticamente relacionados y que existe flujo génico (Beaumont, 2005). Por otro lado, al analizar los coeficientes F_{st} por regiones se observan valores que de acuerdo a los parámetros de Wright (1969), las regiones poseen una moderada diferenciación genética. Pero cómo se relaciona esto con el bajo valor de H_o obtenido en la muestra poblacional de guayaba, para explicar esto se debe establecer que la guayaba se entrecruza en un porcentaje de alrededor del 40%, lo que permite la existencia de flujo génico (Sithther, et al., 2014). Además, lo que permite también el flujo génico son los animales que dispersan las semillas tras haber ingerido el fruto (Somarriba, 1985).

Es importante mencionar que en el STRUCTURE $K=3$ se observa que el linaje representado por el color amarillo constituye únicamente un pequeño porcentaje de la población total analizada concentrado principalmente en la zona Sur del Ecuador. Al analizar los resultados de STRUCTURE $K=2$ se evidencia que los individuos que pertenecen al linaje amarillo continuaron manteniéndose como un grupo separado mientras que los otros dos linajes se agruparon en un solo grupo. Esto podría sugerir que el linaje amarillo se pueda tratar de un tipo

de variedad nueva de guayaba ya que se evidencia claramente como estos individuos se diferencian del resto de la población analizada.

Las distancias genéticas de Nei establecen que existe una relación cercana entre las 9 regiones establecidas del continente. Se encontró una relación genética más cercana en aquellas regiones que se encuentran más cercanas geográficamente (Tabla 6). Sin embargo, como se muestra en los resultados de la Prueba de Mantel, no existe una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de cada uno de los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental. Se ha mencionado que la divergencia genética puede estar dado por un gran número de factores diferentes a la distancia geográfica como flujo génico, la selección natural, deriva génica o selección sexual (Wang & Summers, 2010). Por lo tanto, como se mencionó antes si existe flujo génico entre la población pero también se sugiere que otra causa probable para la semejanza o diferencia genética entre las poblaciones del continente sea la selección natural, es decir la adaptabilidad a diferentes condiciones ambientales debido a que en Ecuador existen una gran cantidad de ambientes con diferentes características climatológicas que dependen de la ubicación geográfica del país. Es importante mencionar que la guayaba tiene la capacidad de crecer y reproducirse en un amplio rango de condiciones y esto ha permitido su expansión a diversos tipos de ecosistemas (Nagar, et al., 2017). Entonces, la influencia del ambiente pudo haber dado lugar a la divergencia genética pero no se debe dejar de lado el hecho de que es posible que si exista una influencia por distancia geográfica que no se refleje en los resultados de la prueba de Mantel debido a que este factor puede verse opacado por las otras condiciones mencionadas (Richter, et al., 2009). Cabe resaltar que a pesar de que los microsatélites sean considerados marcadores moleculares selectivamente neutros, un gran número de estudios indica que los microsatélites pueden tener funciones importantes como la regulación o funcionamiento de los

genes (Li, et al., 2008). En base a esto, se puede establecer que existe evidencia de que los marcadores microsatélites pueden encontrarse afectados por presiones selectivas (Oliveira, et al., 2006).

8.3 Estructura poblacional de los individuos de *Psidium guajava* en Ecuador continental versus Islas Galápagos

Por otro lado, el análisis de STRUCTURE que involucra a las islas de San Cristóbal, Santa Cruz Isabela y Ecuador continental dio un K óptimo de 2, esto indica que las poblaciones de las Islas Galápagos pertenecen a un grupo distinto al de Ecuador Continental. Este resultado establece que no se mantiene un flujo génico entre las poblaciones del continente y la región insular lo que se relaciona con su falta de conectividad por la separación oceánica (Planter, 2007). Además de que actualmente se encuentra prohibido ingresar productos agrícolas a las Islas Galápagos (ABG, 2013). Esto se relaciona con los resultados de distancias genéticas obtenidas al considerar los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental y de las Islas Galápagos ya que se observa una diferenciación clara entre las poblaciones de Ecuador Continental y las Islas Galápagos.

Por otro lado, es importante analizar el resultado obtenido del STRUCTURE que incluye a los individuos de *P. guajava* de San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela ya que al tomar en cuenta el K óptimo (K=3) se observa como en la isla Santa Cruz existe una mezcla de los linajes de San Cristóbal e Isabela. Esto concuerda con otro estudio realizado sobre la caracterización de la diversidad genética de *P. guajava* en Galápagos en el cual se determinó mediante análisis bayesianos de probabilidad que la población de guayaba en Santa Cruz es el resultado de una mezcla entre los pools genéticos de los individuos de San Cristóbal e Isabela (Urquía, et al., 2019).

Al comparar las distancias genéticas entre el continente y el archipiélago se ve una alta diferenciación entre las regiones de continente y las islas Santa Cruz e Isabela; sin embargo, existe

una cercanía entre los individuos de Sierra Centro y San Cristóbal (Tabla 6). Esto concuerda con lo que se visualiza en el dendograma Neighbor joining (Figura 10b). Esta información permite inferir que la posible población de origen de la guayaba en las Islas Galápagos corresponde a la zona Sierra centro, dentro de esta población se encuentran las provincias de Bolívar, Tungurahua y norte del Azuay (Tabla 2).

Es importante analizar si existe alguna conexión entre lo observado a nivel genético y la historia de colonización humana de las Islas Galápagos. De acuerdo a la historia, Manuel Cobos es considerado el primer colonizados de la Isla San Cristóbal en 1880, donde fundó su hacienda El Progreso dedicada a la agricultura de caña de azúcar para lo cual traía mano de obra del centro y sur del Ecuador (Brewington, 2001). La historia señala que Manuel Cobos introdujo la guayaba a la Isla de San Cristóbal debido a que cultivaba sus frutos para el consumo y utilizaba la corteza para curtir pieles de ganado (Guevara, 2015). Esto concuerda con los análisis reportados para este estudio, en donde se sugiere el posible origen de la guayaba proviene de la zona Centro del continente. Por otro lado, existen dos acontecimientos históricos de importancia que respaldan lo observado a nivel genético. En primer lugar se encuentra al alto flujo migratorio existente a causa del terremoto de 1949 que afectó severamente a la provincia de Tungurahua (Granda y Choéz, 2013). Además, llegó a Galápagos gente de la provincia de Loja debido fuertes sequías que afectaron a la población y su economía lo que obligó a las personas a migrar a otras zonas del país, como las Islas Galápagos (Granda y Choéz, 2013).

8.4 Evaluación de patrones de introducción

El análisis bayesiano de los modelos establecidos en base a los linajes de STRUCTURE dieron como resultado que el escenario con mayor probabilidad de ocurrencia, es decir el que explica mejor el set de datos genéticos fue el escenario 2. Este escenario sugiere que el linaje

representado por el color dio origen a la descendencia de las poblaciones de guayaba en las Islas Galápagos. Es importante mencionar que este linaje predomina en la zona centro y sur del continente por lo que no se puede descartar el hecho de que la zona Sur del Ecuador también haya aportado al pool genético de la guayaba en Galápagos. Por otro lado, se debe resaltar que estos resultados concuerdan con lo sugerido previamente en el dendograma Neighbor joining de que la guayaba posiblemente proviene de la zona Sierra Centro ya que este linaje se presenta en la zona Centro del Ecuador, con mayor predominancia en la región Sierra centro.

No se debe dejar de lado el escenario 1 ya que posee una probabilidad posterior significativamente alta. Este escenario establece que el linaje representado por el color rojo en el análisis de STRUCTURE pudo haber dado origen a la guayaba en la región insular del Ecuador. Por lo tanto, se sugiere que el linaje rojo pudo aportar a la población de *P. guajava* en las Islas Galápagos pero con una menor proporción que el linaje verde. Finalmente, hay que establecer que los modelos analizados indican una trifurcación directa de los linajes de Ecuador lo que deja incertidumbre acerca de la divergencia de los linajes en Ecuador continental; sin embargo, para este análisis no se considera de importancia los diferentes tiempos en que las poblaciones ancestrales del continente se separaron ya que el objetivo consistió en establecer el origen de *P. guajava*.

En cuanto a los modelos analizados que evalúan el patrón de introducción de *P. guajava* en Galápagos, el escenario que tuvo la probabilidad posterior más alta con un valor de 0.56 fue el escenario 2 el cual sugiere que se produjo una sola introducción en la isla San Cristóbal y a partir de esta la guayaba pasó hacia Isabela. Cabe destacar que estos resultados concuerdan con la historia de colonización humana de las Islas Galápagos. Por lo tanto, se puede asumir que los procesos de migración humana hacia las islas tuvo como consecuencia la introducción de especies presentes

en el continente, como en este caso la guayaba. Sin embargo, no se puede dejar de lado que si existe la posibilidad de que se haya introducido la guayaba de manera independiente a la Isla de Santa Cruz, que es lo que sugiere el escenario 1 con una probabilidad posterior de 0.43.

Es importante mencionar que para la realización de estos escenarios se asumió que Santa Cruz constituía la última isla en ser colonizada por la *especie P. guajava* ya que esta isla fue la última en ser ocupada por el humano. Además, es importante mencionar que se asumió que la población de *P. guajava* de Santa Cruz consiste en una mezcla entre las poblaciones de guayaba de Isabela y San Cristóbal lo cual se pudo evidenciar en el STRUCTURE que involucra a los individuos de Ecuador continental e Islas Galápagos (K=3). Esto concuerda con otro estudio realizado por Urquía et al (2019) en el cual se reporta que Santa Cruz consiste en una mezcla de las poblaciones de las otras dos islas.

9 CONCLUSIONES

La población de *Psidium guajava* en Ecuador continental posee niveles de diversidad genética altos en comparación con lo reportado para las Islas Galápagos. Esto se relaciona con el principio del efecto fundador ya que se sugiere que la población de guayaba en Ecuador continental es la población ancestral que dio origen a la guayaba en la región insular del Ecuador.

Por otro lado, se sugiere que el origen de la guayaba proviene de la zona Sierra Centro del Ecuador, siendo esta zona constituida por las provincias de Tungurahua, Bolívar y Norte del Azuay. Sin embargo, no se descarta el posible aporte genético de la zona Sur del Ecuador a la población de guayaba en las Islas Galápagos.

Además, se sugiere que se dio una única introducción de guayaba a las Islas Galápagos, posiblemente a la isla San Cristóbal. Estos resultados a nivel genético concuerdan con la historia de colonización humana de las Islas Galápagos.

Finalmente, el conocer sobre la historia invasora de una especie, como en este caso la guayaba, permite entender el proceso de invasión, es decir su dinámica y modo de expansión geográfica con el fin de poder establecer programas para el control de esta especie.

10 RECOMENDACIONES

Se recomienda muestrear individuos de aquellas provincias que no fueron consideradas en este estudio y que pueden proveer más información que permita esclarecer el origen de la guayaba como por ejemplo la provincia de Chimborazo.

Es importante analizar más a profundidad los individuos de *P. guajava* que pertenecen al linaje representado por el color amarillo en el gráfico de STRUCTURE de Ecuador continental debido a que aparentan tener una diferenciación genética marcada con el resto de los individuos de los otros dos linajes.

Se recomienda realizar otros escenarios que evalúen más a profundidad los patrones de introducción y colonización de la guayaba en el archipiélago de Galápagos con el fin de esclarecer la historia de colonización de la guayaba en las Islas Galápagos.

11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena ara Galápagos (ABG). (2013). Lista de productos y subproductos y derivados de origen vegetal y animal reglamentados para su ingreso a la provincia de Galápagos. *ABG*.
- Allendorf, F., & Lundquist, L. (2003). Introduction: population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*, 17(1), 24-30.
- Aranguren-Méndez, J., Román, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites, marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *ALPA*, 13(1), 1-6.
- Beaumont, M. (2005). Adaptation and speciation: what can Fst tell us? *Trends in ecology and evolution*, 20(8), 435-440.
- Blacket, M., Robin, C., Good, R., Lee, S., & Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments- an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), 456-463.
- Brewington, L. (2011). *The Politics of Invasion : Defining and Depending the Natural, Native al Legal in the Galapagos Islands of Ecuador*. Chapel Hill: Chapel Hill Press.
- Cázares, E., Núñez, C., Domínguez, J., Luna, C., Rojas, R., & Ledesma, S. (2008). Potential biogeographic distribution of guava (*Psidium guajava*) in Mexico. *International Symposium on Guava and other Myrtaceae*, 849, 55-62.
- Demarchi, D. (2009). Microsatélites, distancias genéticas y estructura poblaciones nativas sudamericanas. *Revista Argentina de antropología biológica*, 11.
- Desjardins, P., & Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolumen: cuantificación de ácidos nucleicos. *Jove*, 45, 25-65.
- Dirección del Parque Nacional Galápagos. (2016). *Especies Invasoras*. Recuperado el 2 de Febrero de 2019, de Gobierno de la República del Ecuador: <http://www.galapagos.gob.ec/especies-invasoras/#>
- Dlugosch, K., & Parker, I. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptative evolution and the role of multiple introductions. *Molecular ecology*, 17(1), 431-449.
- Espinosa, C. (2016). *Medidas de Alpha Diversidad*. UTPL: Ecología en práctica.
- Frankham, R. (2005). Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94(4), 385-387.
- Granda, M., & Choéz, G. (2013). *Sistemas Humanos: Población y migración en Galápagos*. Recuperado el 4 de Febrero de 2019, de Galapagos Conservancy:

- <https://www.galapagos.org/wp-content/uploads/2013/06/2013-6-HUMAN-SYS-pop-migration.leon-salazar.pdf>
- Guevara, C. (2015). Rebelión en Galápagos: La hacienda El Progreso de Manuel J. Cobos en la Isla de San Cristóbal. *Universidad Andina Simón Bolívar*, 1-64.
- Gutiérrez, C. (2009). Estudio sobre la caracterización genética de las razas caprinas mallorquina e ibicenca. *Universidad de Córdoba*.
- Hall, T. (2018). *What Makes Invasive Species so Damaging on Islands?* Recuperado el 2 de Febrero de 2019, de <https://www.islandconservation.org/what-makes-invasive-species-damaging-islands/>
- Heywood, H., & Brunel, S. (2010). Código de conductas sobre horticultura y plantas invasivas. *Naturaleza y Medioambiente del Consejo Europeo*(155).
- Itow, S. (2004). Zonation Pattern, Succession Process and Invasion by Aliens in Species-poor Insular Vegetation of the Galápagos Islands. *Global Environmental Reserach*, 7(1), 39-58.
- Jager, H., Kowarik, I., & Tye, A. (2009). Destruction without extinction: long term impacts of an invasive tree species on Galapagos highland vegetation. *British Ecological Society: Journal of Ecology*, 97, 1252-1263.
- Kumari, S., Arumugam, N., Singh, R., Srivastav, M., Banoth, S., Charu, A., . . . Jeshima, Y. (2017). Diversity analysis of guava (*Psidium guajava*) germplasm collection. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 88(3), 489-497.
- Lawesson, J., & Ortiz, L. (1990). Plantas introducidas en las Islas Galápagos. *Botanical Garden St Louis*, 32, 201-210.
- Lee, C. (2002). Evolutionaty genetics of invasive species. *Trends in ecology & evolution*, 17(8), 386-391.
- Li, Y., Korol, A., Fahima, T., Beiles, A., & Nevo, E. (2008). Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: A review. *Molecular Ecology*, 11(12), 2453-2465.
- Magee, J., McMullen, C., Reaser, J., Spitzer, E., Struve, S., Tufts, C., & Woodruff, G. (2001). Green invaders of the Galapagos Islands. *Science*, 294(5545), 1279-1280.
- Morillo, A., Morillo, Y., Fregene, M., Ramírez, H., Chávez, A., Sánchez, T., . . . Ceballos, H. (2011). Diversidad genética y contenido de carotenos totales en accesiones de yuca (*Mnihot esculenta* Crantz). *Acta Agronómica*(60), 97-107.
- Nagar, P., Satodiya, B., Dhaduk, H., & Prajapati, D. (2017). Genetic variability and bio-chemical screening oif guava (*Psidium guajava*) hybrids. *IJCS*, 5(6), 143-146.
- Oliveira, E., Gomes, J., Zucchi, M., Vencovsky, R., & Carneiro, M. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29(2).

- Planter, E. (2007). Flujos genéticos: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. *Ecología Molecular*, 49-61.
- Ponce, M. (2016). Determinación de la diversidad genética del guayabillo (*Psidium galapegeium*) y comparación con la diversidad genética encontrada en la guayaba en la Isla San Cristóbal. *Trabajo de Titulación para Ingeniería en Procesos Biotecnológicos Universidad San Francisco de Quito*.
- Porter, D. (1969). *Psidium* (Myrtaceae) in the Galapagos Islands. *Missouri Botanical Garden*, 55, 368-371.
- Prentis, P., Wilson, J., Dormontt, E., Richardson, D., & Lowe, A. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in plant science*, 13(6), 288-294.
- 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.
- Reed, D., & Frankham, R. (2003). Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation biology*, 17(1), 230-237.
- Richter, M., Diertl, K., Emck, P., Peters, T., & Beck, E. (2009). Reasons for an outstanding plant diversity in tropical Andes of Ecuador. *Landscape online*, 12, 1-35.
- Risterucci, A., Duval, M., Rohde, W., & Billotte, N. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci from *Psidium guajava* L. *Molecular Ecology Notes*, 5, 745-748.
- Rocha, P. (2002). Theory and practice for the extraction and purification of the oil palm DNA. *Palmas*, 23(3), 9-17.
- Rodríguez, N., Valdés, J., Becker, D., Velasques, B., Coto, O., Rhode, W., & Ritter, E. (2004). Morphological, agronomic and molecular characterization of Cuban accessions of guava (*Psidium guajava*). *Journal of Genetics and Breeding*.
- Sakai, A., Allendorf, F., Holt, J., Lodge, D., Moolenaar, J., & McCauley, D. (2001). The population biology of invasive species. *Annual review of ecology and systematics*, 32(1), 305-332.
- Sax, F., & Gaines, S. (2008). Species invasions and extinction: the future of native biodiversity on islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(1), 490-497.
- Sitther, V., Zhang, D., Harris, D., Yadav, A., Zee, F., Meinhardt, L., & Dhekney, S. (2014). Genetic characterization of guava (*Psidium guajava*) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(4), 829-839.
- Somarrriba, E. (1985). Árboles de guayaba: consumo de fruta y dispersión de semillas. *Organización para Estudios Tropicales*, 35(4), 329-332.
- Spielman, D., Brook, B., Briscoe, D., & Frankham, R. (2004). Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease disease resistance? *Conservation Genetics*, 5(4), 439-448.

- Teulat, B., Aldam, C., Trehin, R., Lebrun, P., Barker, J., Arnold, G., . . . Rognon, F. (2000). An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) populations from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites SSRs and AFLPs. *Springer*, 100, 764-771.
- Trevor, M. (2015). The Undergraduate Guide to R. *Princeton University*, 1-68.
- Trujillo, J., Delgado, P., Ramírez, I., Rebolledo, V., & Pérez, N. (2013). Variación genética en poblaciones mexicanas en *Swetenia macrophyllam* una especie tropical en expansión geográfica. *Botanical Sciences*, 91(3), 307-317.
- Urquía, D. (2018). Estudio de la diversidad genética de la población de *Psidium guajava* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Quito: USFQ.
- Urquía, D., Gutierrez, B., Pozo, G., Pozo, M., Espín, A., & De Lourdes Torres, M. (2019). *Psidium guajava* in the Galapagos Islands: population genetics and history of an invasive species. *PLOSONE*.
- Valdés-Infante, J., Rodríguez, N., Becker, D., Velázquez, B., Sourd, D., Espinosa, G., & Rohde, W. (2007). Microsatellite characterization of guava (*Psidium guajava*) germplasm collection in Cuba. *Cultivos Tropicales*, 28, 61-67.
- Varshney, R., Graner, A., & Sorrells, M. (2005). Genic microsatellites markers n plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*, 23(1), 48-55.
- Wang, I., & Summers, K. (2010). Genetic structure is correlated with phenotypic divergen rather than geographic isoation in the highlt polymorphic strawberry posion-dart frog. *Molecular Ecology*, 19, 447-458.
- Wright, S. (1969). Evolution and genetics of populations. The theory of gene frequencies, volume Vol. 2.
- Zahos, F., & Habel, J. (2011). Biodiversity hotspots:distribution and protection of conservation priority areas. *Springer Science* .

12 TABLAS

Tabla 1 Secuencias de los 13 loci microsatélites utilizados para la amplificación de los individuos de *P. guajava* (Riesterucci, et al., 2005). Se muestran las secuencias tanto forward como reverse de los primers utilizados en este estudio.

| Locus | Primer <i>Forward</i> ¹ | Primer <i>Reverse</i> |
|----------|------------------------------------|-----------------------|
| mPgCIR05 | GCCTTTGAACCACATC | TCAATACGAGAGGCAATA |
| mPgCIR07 | ATGGAGGTAGGTTGATG | CGTAGTAATCGAAGAAATG |
| mPgCIR08 | ACTTTCGGTCTCAACAAG | AGGCTTCTACAAAAGTG |
| mPgCIR09 | GCGTGTCTGATTGTTTC | ATTTTCTTCTGCCTTGTC |
| mPgCIR10 | GTTGGCTCTTATTTTGGT | GCCCCATATCTAGGAAG |
| mPgCIR11 | TGAAAGACAACAACGAG | TTACACCCACCTAAATAAGA |
| mPgCIR13 | CCTTTTCCCGACCATTACA | TCGCACTGAGATTTTGTGCT |
| mPgCIR17 | CCTTTCGTCATATTCACCTT | CATTGGATGGTTGACAT |
| mPgCIR18 | TAAGCTGCATGTGTGC | ATGGCTTTGGATGAAA |
| mPgCIR21 | TGCCCTTCTAAGTATAACAG | AGTACAAACCTTCCTAAA |
| mPgCIR22 | CATAAGGACATTTGAGGAA | AATAAGAAAGCGAGCAGA |
| mPgCIR25 | GACAATCCAATCTCACTTT | TGTGTCAAGCATAACCTTC |
| mPgCIR26 | CTACCAAGGAGATAGCAAG | GAAATGGAGACTTTGGAG |

¹ En esta tabla no se indica la secuencia de oligonucleótidos de la cola universal añadida al primer forward.

Tabla 2 Agrupación de las provincias donde se recolectaron individuos de *P. guajava* en poblaciones por región y por eje de norte a sur. Se observan las localidades que corresponden a cada provincia.

| | Costa | Localidades | Sierra | Localidades | Oriente | Localidades |
|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------|------------------|
| Zona Norte | Esmeraldas | La Unión | Imbabura | Lita | Sucumbios | Gonzalo Pizarro |
| | | Cube | | Ambuquí | | Shushufindi |
| | San mateo | Peña Negra | Santa Cecilia | | | |
| Manabi | El Carmen | Chone | Pichincha | Nanegalito | Orellana | Macarena |
| | | | Pedro Vicente | Guayllabamba | | Loreto |
| | Santo Domingo | Valle Hermosa | Napo | Nerupa | | |
| | | | Alluriquín | | | Borja |
| Zona Centro | Manabi | Montecristi | Bolivar | Caluma | Napo | Misahualli |
| | | Puerto Lópéz | | Echandía | | Carlos Arosemena |
| | Los Ríos | Vinces | Tungurahua | Patate | Pastaza | Shell |
| | | Pueblo Viejo | | Agoyán | | Santa Clara |
| Santa Elena | Manglar Alto | | Río Verde | | | |
| Guayas | Nobol | Azuay | Paute | Morona | | Macas |
| | Palestina | | | Santiago | | |
| | Balzar | | | | | |
| Zona Sur | El Oro | Pasaje | Azuay | La Victoria | Morona | San Juan Bosco |
| | | Santa Rosa | | Santa Isabela | Santiago | Gualaquiza |
| | Huaquillas | Loja | Cotacocha | Zamora | Chinchi | Valladolid |
| | Saracay | | Álamo | | | Cumbaratze |
| | Zaruma | | Zapotillo | | | Palanda |
| | | Macará | | | Zamora | |
| | | Cariamanga | | | Yantzaza | |
| | | Catamayo | | | | |
| | | Vilcabamba | | | | |

Tabla 3 Loci microsatélite que fueron utilizados en este estudio (Riesterucci, et al., 2005), y los fluoróforos correspondiente a cada locus. Además, se indica la temperatura de hibridación y el número de ciclos que fue utilizado en PCR para una amplificación eficiente.

| Locus | Fluoróforo | Temperatura Hibridación ¹ | No. Ciclos |
|----------|------------|--------------------------------------|------------|
| mPgCIR09 | 6FAM | 55°C | 30 |
| mPgCIR07 | VIC | 55°C | 30 |
| mPgCIR08 | PET | 55°C | 30 |
| mPgCIR11 | NED | 55°C | 30 |
| mPgCIR10 | VIC | 55°C | 35 |
| mPgCIR13 | PET | 55°C | 35 |
| mPgCIR17 | NED | 55°C | 35 |
| mPgCIR22 | 6FAM | 55°C | 35 |
| mPgCIR25 | NED | 54°C | 35 |
| mPgCIR26 | PET | 55°C | 35 |
| mPgCIR05 | VIC | 55°C | 35 |
| mPgCIR18 | PET | 55°C | 35 |
| mPgCIR21 | NED | 55°C | 35 |

¹ Estas temperaturas de hibridación de la técnica de PCR corresponden al método de 3 primers, en el cual se encuentra el primer forward modificado con la cola universal y un primer marcado con fluoróforo complementario a la cola universal.

Tabla 4 Indicadores de diversidad genética de cada locus microsatélite utilizado en este estudio para los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental.

| Locus | No. Alelos | Ho | He |
|----------|------------|------|------|
| mPgCIR09 | 9 | 0.2 | 0.58 |
| mPgCIR07 | 9 | 0.29 | 0.77 |
| mPgCIR08 | 14 | 0.23 | 0.64 |
| mPgCIR11 | 6 | 0.4 | 0.68 |
| mPgCIR10 | 24 | 0.3 | 0.92 |
| mPgCIR13 | 7 | 0.12 | 0.67 |
| mPgCIR17 | 16 | 0.37 | 0.87 |
| mPgCIR22 | 13 | 0.29 | 0.8 |
| mPgCIR25 | 12 | 0.26 | 0.8 |
| mPgCIR05 | 22 | 0.37 | 0.88 |
| mPgCIR18 | 10 | 0.39 | 0.73 |
| mPgCIR21 | 9 | 0.18 | 0.75 |

Tabla 5 Indicadores de diversidad genética para los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental. Para cada una de las regiones se muestra el número de alelos, heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el número de alelos privados.

| Regiones | No. de alelos | H_o | H_e | Alelos privados |
|----------------------------------|----------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| Costa Norte | 40 | 0.1 | 0.49 | 4 |
| Sierra Norte | 57 | 0.2 | 0.63 | 4 |
| Amazonía Norte | 68 | 0.42 | 0.68 | 11 |
| Costa Centro | 59 | 0.17 | 0.61 | 6 |
| Sierra Centro | 40 | 0.32 | 0.65 | 9 |
| Amazonía Centro | 59 | 0.41 | 0.67 | 7 |
| Costa Sur | 65 | 0.27 | 0.72 | 5 |
| Sierra Sur | 71 | 0.31 | 0.70 | 13 |
| Amazonía Sur | 62 | 0.24 | 0.64 | 14 |
| Total Ecuador continental | 151 | 0.27 | 0.7 | - |

Tabla 6 Distancias genéticas de Nei entre las 9 regiones establecidas de Ecuador continental

| | Costa Norte | Costa Centro | Sierra Norte | Amazonía Norte | Amazonía Centro | Sierra Centro | Costa Sur | Sierra Sur |
|------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|------------------|-------------------|
| Costa Centro | 0.2 | | | | | | | |
| Sierra Norte | 0.20 | 0.31 | | | | | | |
| Amazonía Norte | 0.27 | 0.4 | 0.2 | | | | | |
| Amazonía Centro | 0.39 | 0.35 | 0.42 | 0.29 | | | | |
| Sierra Centro | 0.45 | 0.18 | 0.37 | 0.5 | 0.43 | | | |
| Costa Sur | 0.44 | 0.53 | 0.41 | 0.47 | 0.52 | 0.46 | | |
| Sierra Sur | 0.52 | 0.36 | 0.5 | 0.57 | 0.57 | 0.27 | 0.35 | |
| Amazonía Sur | 0.78 | 0.77 | 0.63 | 0.57 | 0.77 | 0.50 | 0.47 | 0.42 |

Tabla 7 Coeficiente Fst entre las 9 regiones establecidas de Ecuador continental

| | Costa Norte | Sierra Norte | Amazonía Norte | Costa Centro | Sierra Centro | Amazonía Centro | Costa Sur | Sierra Sur |
|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|----------------------|------------------------|------------------|-------------------|
| Sierra Norte | 0.07 | | | | | | | |
| Amazonía Norte | 0.07 | 0.08 | | | | | | |
| Costa Centro | 0.08 | 0.08 | 0.05 | | | | | |
| Sierra Centro | 0.11 | 0.08 | 0.08 | 0.05 | | | | |
| Amazonía Centro | 0.12 | 0.05 | 0.08 | 0.09 | 0.08 | | | |
| Costa Sur | 0.11 | 0.09 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | 0.08 | | |
| Sierra Sur | 0.11 | 0.07 | 0.09 | 0.09 | 0.08 | 0.05 | 0.06 | |
| Amazonía Sur | 0.17 | 0.14 | 0.11 | 0.1 | 0.12 | 0.1 | 0.08 | 0.08 |
| Fst Ecuador continental | | | | | | | 0.08 | |

13 FIGURAS



Figura 1 Ejemplo de un individuo de *Psidium guajava* recolectado en Ecuador continental en la localidad Pedro Vicente en la provincia de Pichincha.

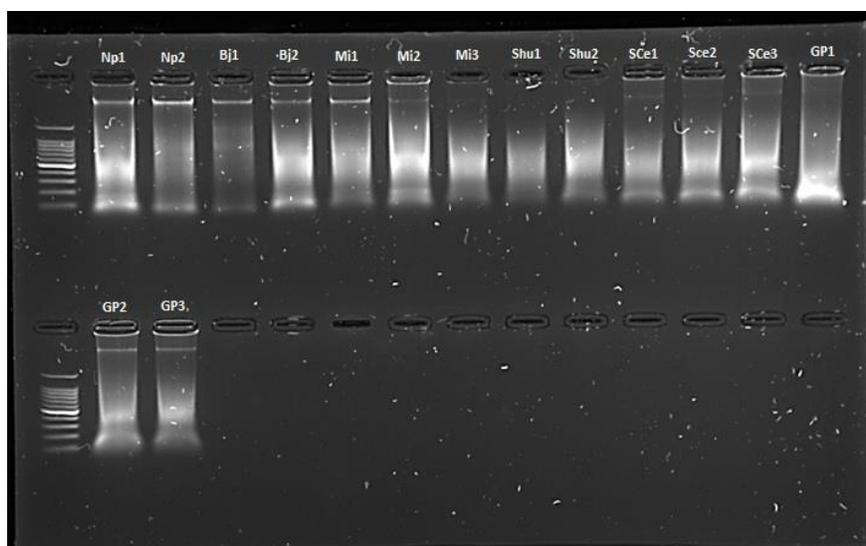


Figura 2 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% del ADN genómico extraído de individuos de *P. guajava* utilizando el método de extracción con CTAB.

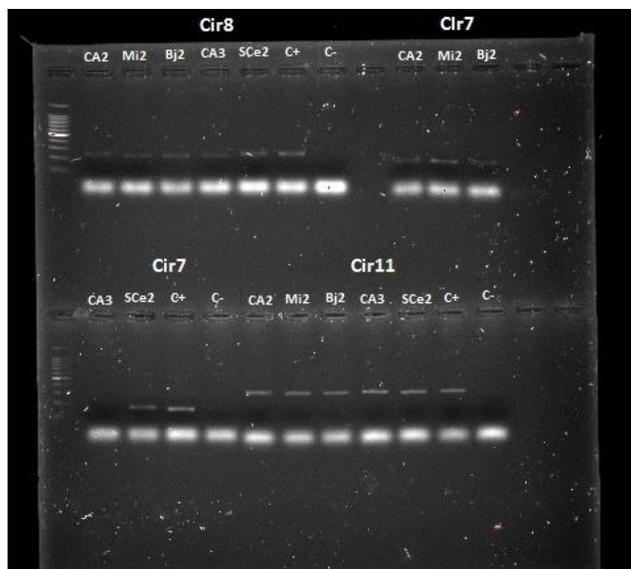


Figura 3 Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de amplificación mediante técnica de PCR. Los diferentes carriles corresponden a los individuos de *P. guajava* recolectados en Ecuador continental, siendo las muestras pertenecientes a las localidades Carlos Arosemena (CA), Misahualli (Mi), Borja (Bj) y Santa Cecilia (SCe), los cuales fueron amplificados utilizando diferentes loci, en este caso mPgCIR08, mPgCIR07 y mPgCIR11. Los primeros pocillos de cada carril corresponde al Ladder de referencia de 100bp de Invitrogen. Los carriles rotulados C+ y C-, corresponden a los controles positivos y negativo, respectivamente.

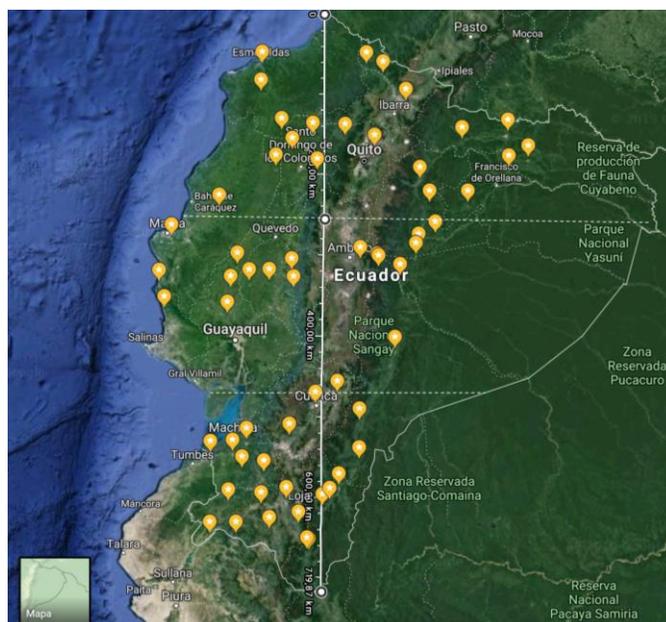


Figura 4 Mapa de Ecuador que muestra las localidades muestreadas y las divisiones de norte a sur realizadas con el fin de agrupar los individuos en tres zonas: Norte, centro y sur.

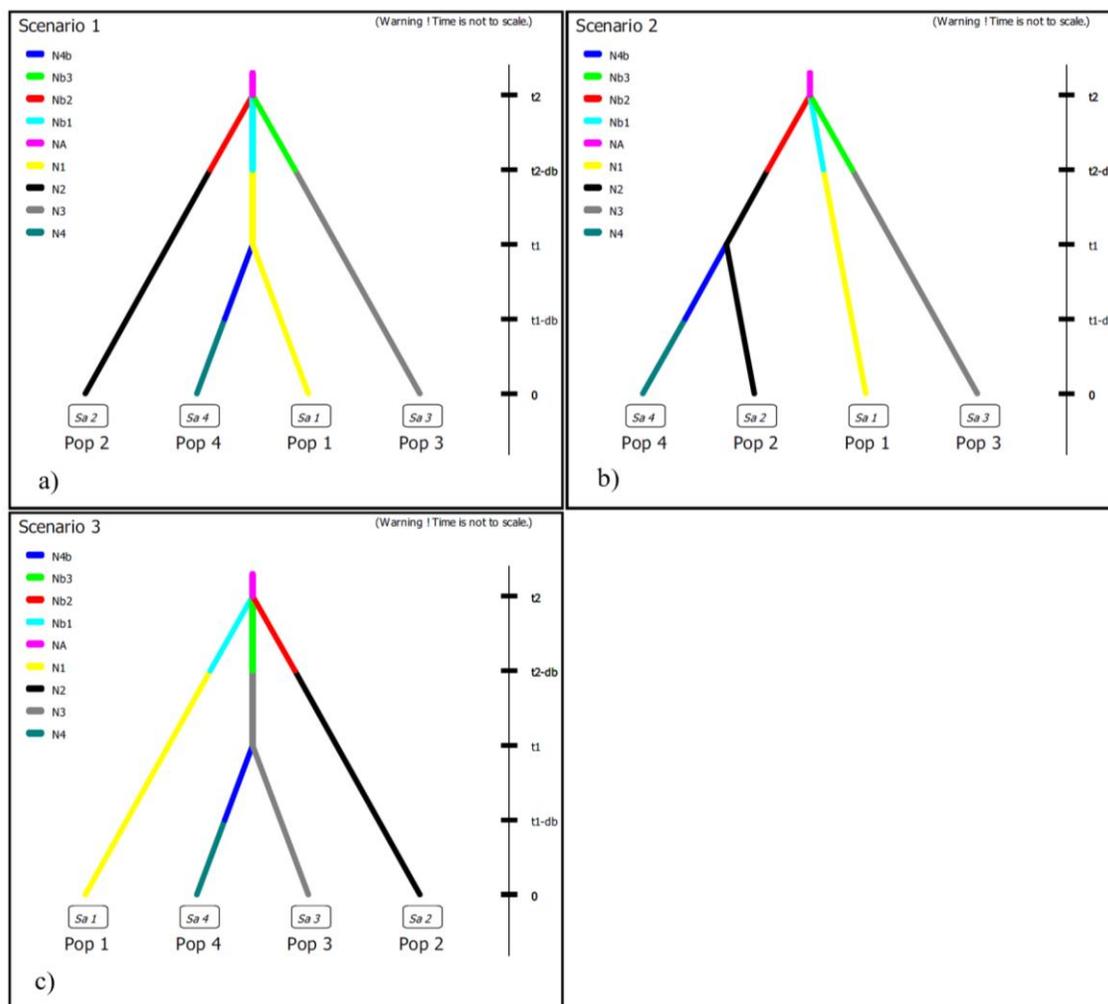


Figura 5 Escenarios de análisis de origen de *P. guajava* en Islas Galápagos utilizando el programa DIYABC. a) Escenario 1. b) Escenario 2. c) Escenario 3. Se debe mencionar que en todos los escenarios Pop1, Pop2 y Pop3 son los individuos de Ecuador continental divididos en base a los tres linajes reportados en STRUCTURE, siendo Pop1 linaje rojo, Pop2 linaje verde y Pop 3 linaje amarillo. Pop4 constituye a todos los individuos de las islas Santa Cruz, San Cristóbal e Isabela.

Nota: El único tiempo de divergencia a escala corresponde a t1 y t2.

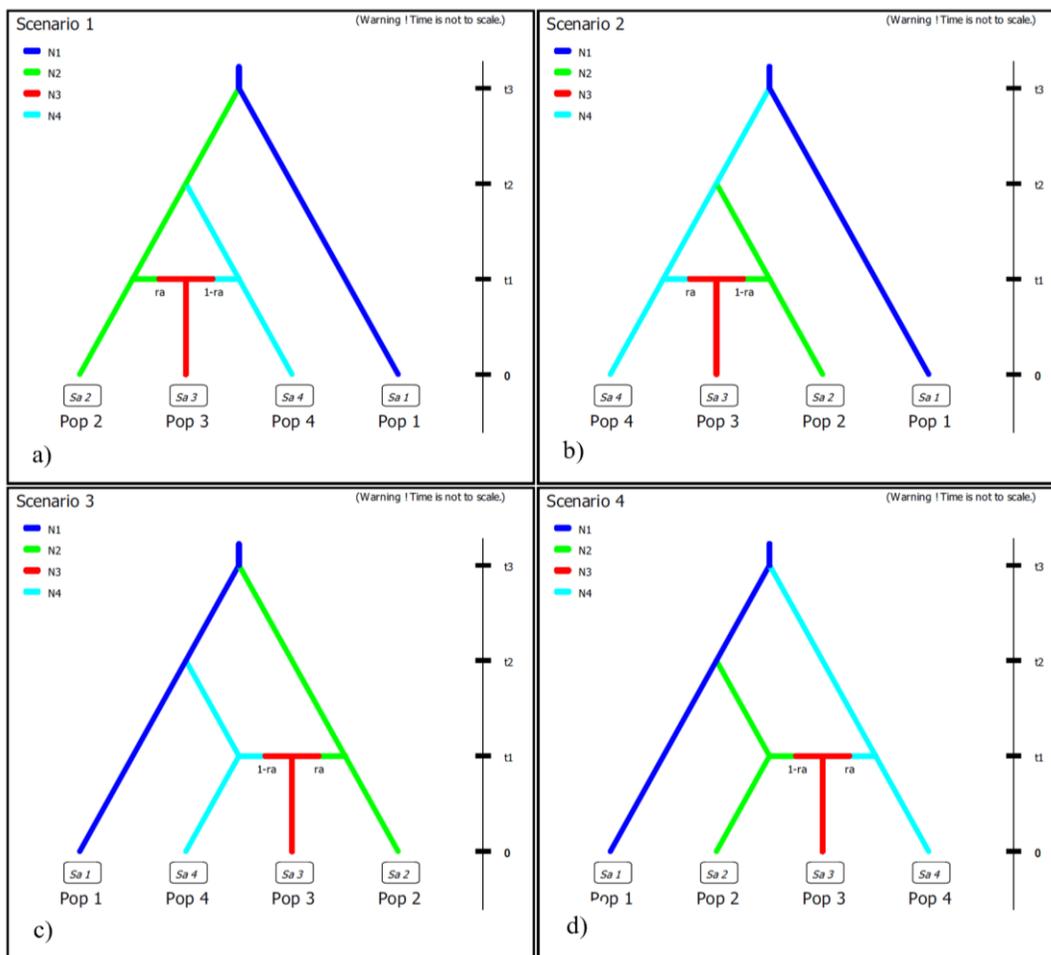


Figura 6 Escenarios de los patrones de introducción de *P. guajava* en Islas Galápagos utilizando el programa DIYABC. a) Escenario 1. b) Escenario 2. c) Escenario 3. d) Escenario 4. Se debe mencionar que en todos los escenarios Pop1 corresponde a los individuos de Ecuador continental, Pop2 son los individuos de Isabela, Pop3 es la población de Santa Cruz y finalmente Pop4 es San Cristóbal.

Nota: El único tiempo de divergencia a escala corresponde a t_1 .

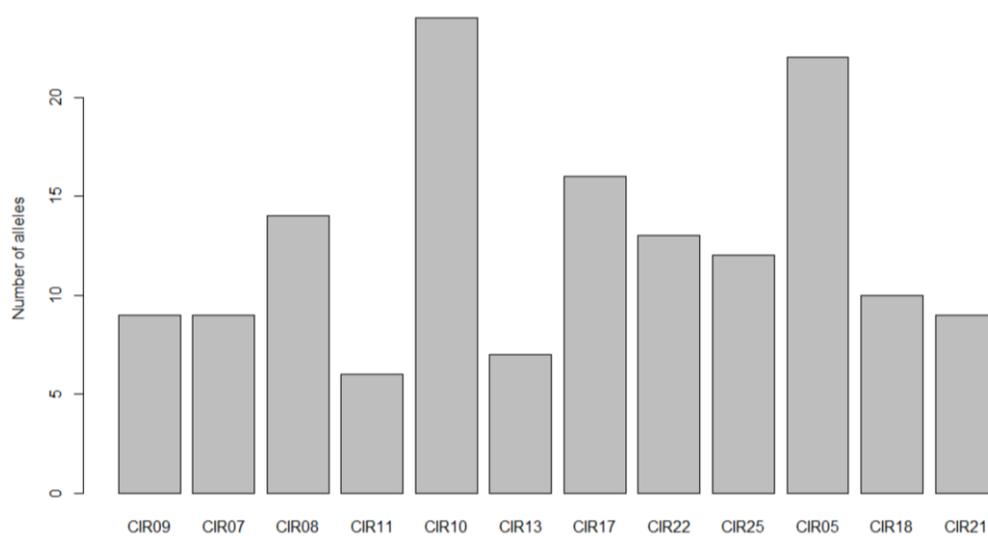


Figura 7 Número de alelos de cada uno de los loci microsatélites utilizados en este estudio.

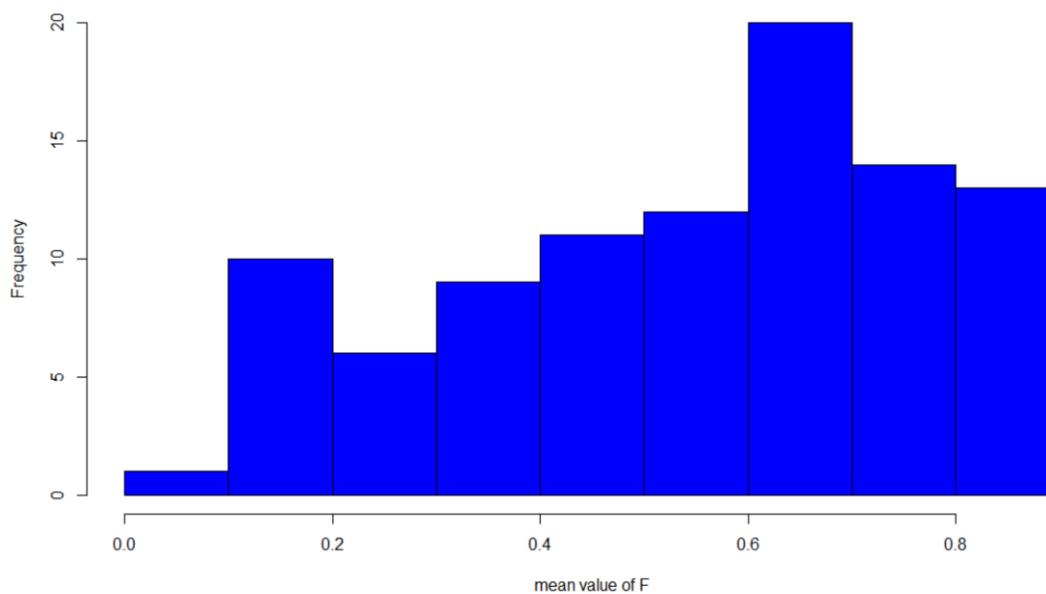


Figura 8 Media de las frecuencias de los coeficientes de endogamia de los 96 individuos de *P. guajava* de Ecuador continental.

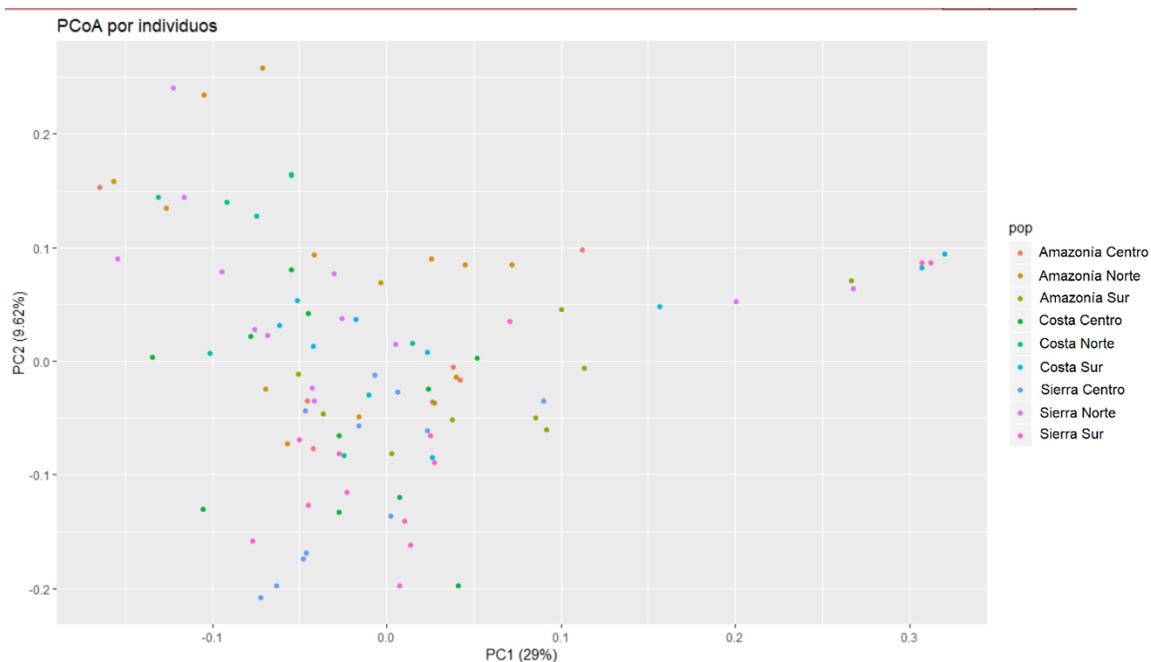


Figura 9 PCoA de los individuos de *P. guajava* de las poblaciones definidas de Ecuador continental. En la leyenda se indican los colores que corresponden a cada población de Ecuador continental y a cada una de las tres islas de Galápagos.

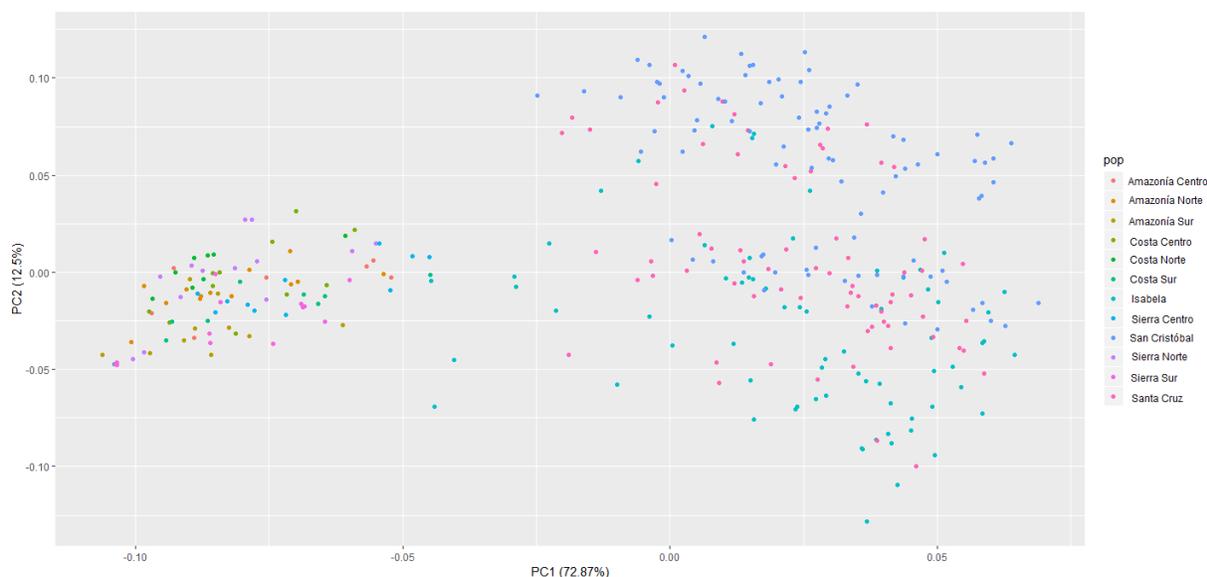


Figura 10 PCoA de los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental y de las Islas Galápagos, específicamente de San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela. En la leyenda se indican los colores que corresponden a cada región de Ecuador continental y a cada una de las tres islas de Galápagos.

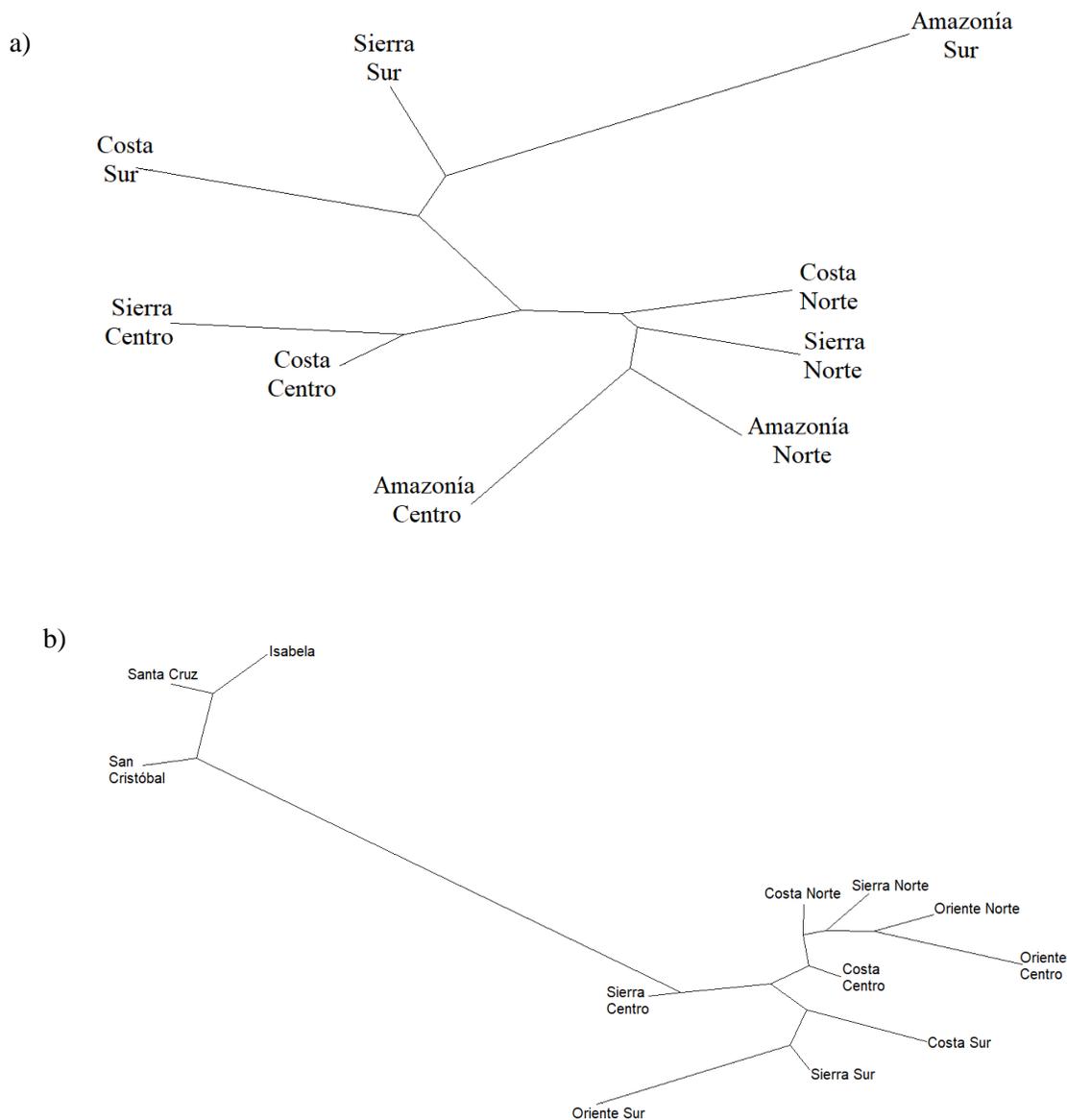


Figura 11 Dendrograma Neighbor Joining de las poblaciones de *Psidium guajava* analizadas. a) Dendrograma Neighbor Joining de la muestra poblacional de Ecuador continental en donde la longitud de las ramas corresponde a la distancia genética existente entre cada población. b) Dendrograma Neighbor joining que incluye a las poblaciones de Ecuador continental, Isabela, Santa Cruz y San Cristóbal.

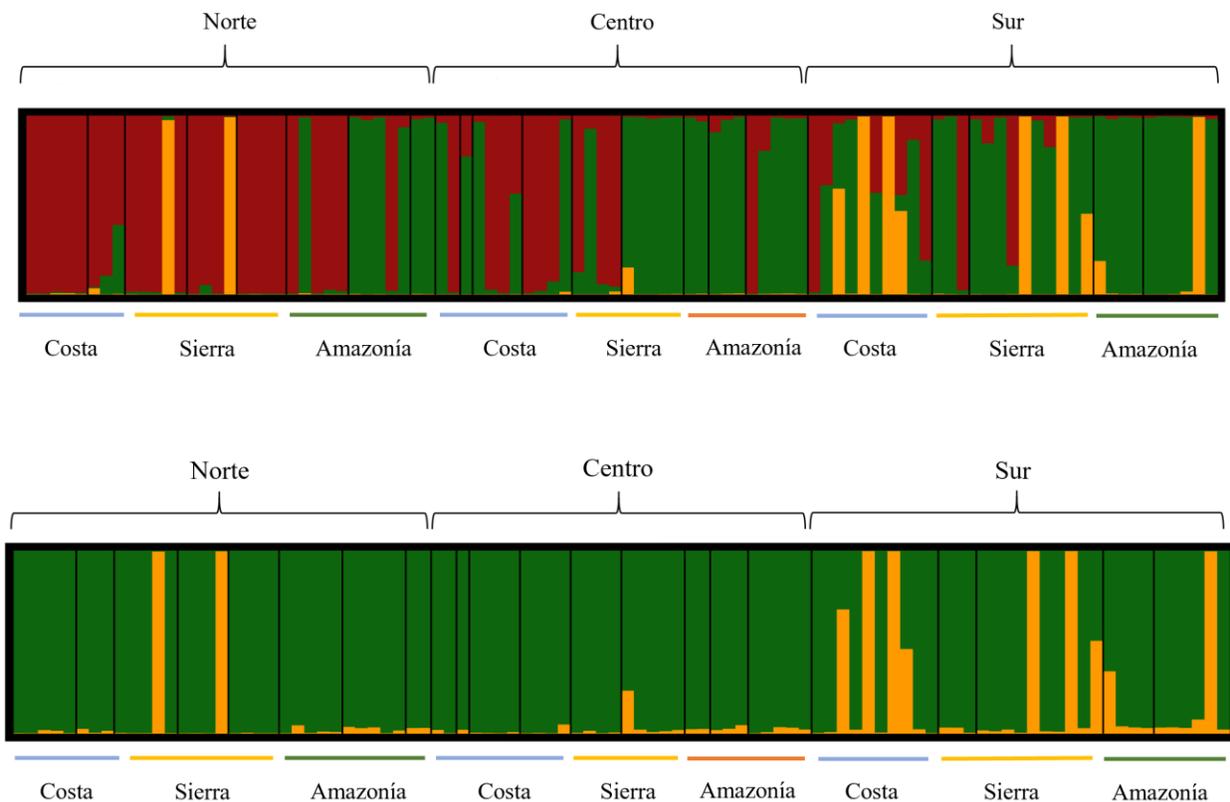


Figura 12 Análisis de STRUCTURE de los individuos de las poblaciones que pertenecen a Ecuador continental agrupados por su región y zona latitudinal. a) Este resultado considera un K óptimo de 3 en base a un $\Delta K=84.13$. b) Gráfico de STRUCTURE con un K=2 que posee un $\Delta K=0.49$.

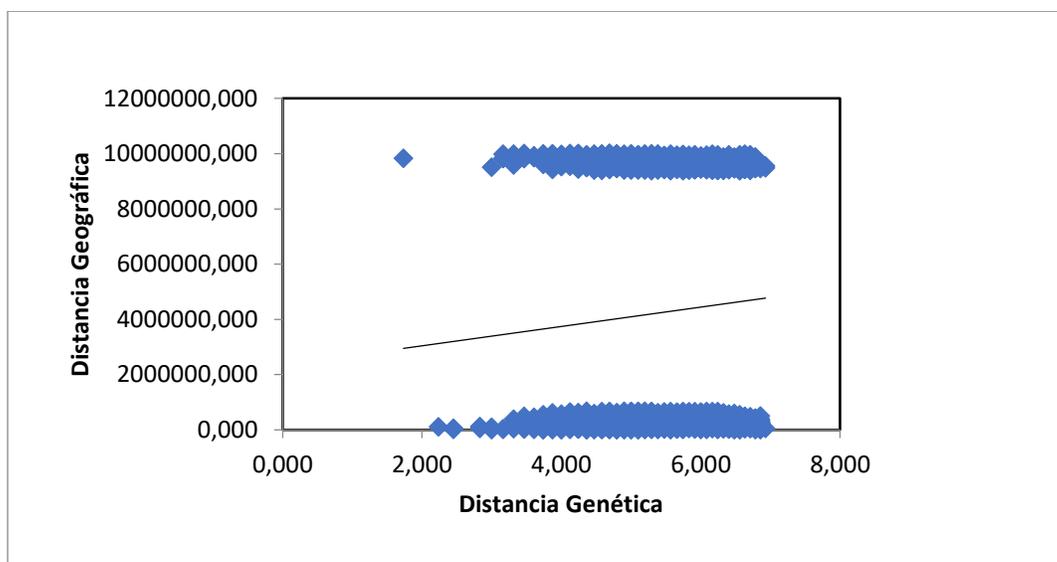


Figura 13 Prueba de Mantel de los individuos de *P. guajava* de Ecuador continental. Valor P obtenido igual a 0.120.

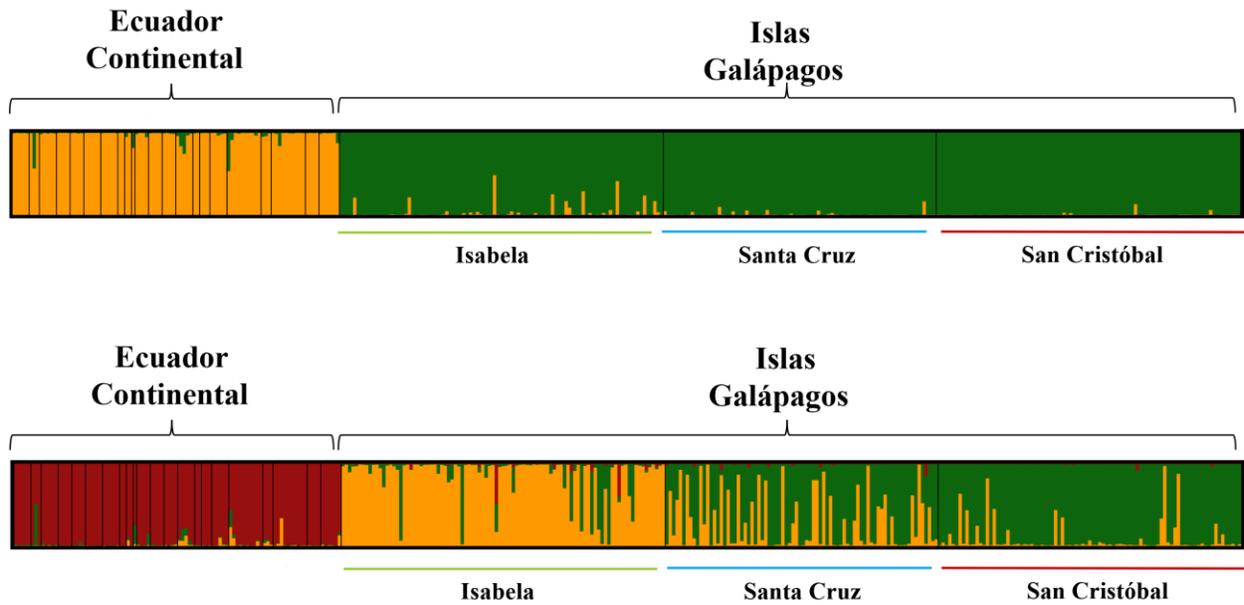


Figura 14 Resultados de STRUCTURE incluyendo a los individuos del continente y del archipiélago. a) Resultado considerando el K óptimo de 2 que tenía un valor de $\Delta K=737.29$. b) Gráfico de STRUCTURE con un K=3, segundo mejor valor con un $\Delta K=58.38$.

14 ANEXOS

Anexo A Provincias de recolección de los individuos de *Psidium guajava* en Ecuador continental. Se indican las localidades pertenecientes a cada provincia, el nombre de la muestra, las coordenadas y la altitud geográfica a la que los individuos fueron muestreados en la salida de campo realizada en los meses de Mayo, Junio y Julio de 2017.

| Provincia | Localidad | Nombre muestra | Coordenadas | Altura sobre el nivel del mar (msnm) |
|-----------|-----------------|----------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| NAPO | Carlos Arosema | GCa1 | N 01°10'35" W 77°51'38.16" | 525 |
| | | GCa2 | N 01°9'23.9" W 77°51'3.1" | 505 |
| | | GCa3 | N 01°8'19.3" W 77°50'6.6" | 498 |
| | Misahualli | GMi1 | N 01°3'6.3" W 77°42'14.4" | 424 |
| | | GMi2 | N 01°03'12.4" W 72°39'48.8" | 424 |
| | | GMi3 | N 01°03'59" W 77°39'00.1" | 411 |
| | Nerupa | GNp1 | N 00°43'38.8" W 77°45'56.9" | 1113 |
| | | GNp2 | N 00°41'26.8" W 77°44'8.1" | 1174 |
| | Borja | GBj1 | N 00°26'59.9" W 77°52'33.3" | 1857 |
| | | GBj2 | N 00°27'44.5" W 77°54'18.8" | 1837 |
| SUCUMBÍOS | Shushufindi | GShu1 | S 00° 10'56.7" W 76° 47'34.4" | 284 |
| | | GShu2 | N 00°11'6.4" W 76°44'38.7" | 274 |
| | Santa Cecilia | GSCe1 | N 00°05'05.2" W 77°04'23.6" | 327 |
| | | GSCe2 | N 00°05'07.1" W 77°07'23.1" | 348 |
| | | GSCe3 | N 00°05'14.4" W 77°10'06.1" | 360 |
| | Gonzalo Pizarro | GGp1 | N 00° 02'18.9" W 77°20'39.4" | 507 |
| | | GGp2 | N 00°01'04.4" W 77°22'40.9" | 567 |
| | | GGp3 | S 00° 00'07.4" W 77°24'25.6" | 714 |
| | ORELLANA | Loreto | GLo1 | N 00°39'20.9" W 77°18'32.2" |
| GLo2 | | | N 00°07'18" W 77°18'17.8" | 447 |
| GLo3 | | | N 00°37'04" W 77°17'31.7" | 415 |
| Macarena | | GMa1 | N 00°19'08.1" W 76°56'53.1" | 280 |
| | | GMa2 | N 00°17'47.8" W 76°56'50.2" | 281 |
| | | GMa3 | N 00°19'17.4" W 76°53'25.8" | 274 |
| PASTAZA | Shell | GSh1 | S 01°28'38.7" W 78°5'29.1" | 1133 |
| | | GSh2 | S 01°29'08.7" W 78°04'57.0" | 1113 |
| | | GSh3 | S 01°30'20.9" W 78°02'41.3" | 1000 |
| | Santa Clara | GSC1 | S 01°24'6.4" W 77°58'57.8" | 1072 |
| | | GSC2 | S 01°23'06.8" W 77°58'27.2" | 1078 |
| | | GSC3 | S 01°20'43.8" W 77°55'19.7" | 1037 |
| IMBABURA | Lita | GLi1 | N 01°51'56.3" W 78°26'59.8" | 598 |

| | | | | | |
|-------------------------|--------------|-------------|----------------------------------|-----------------------------|------|
| | | GLi2 | N 00°52'04.2" W 78°26'44.5" | 654 | |
| | | GLi3 | N 00°52'04.2" W 78°26'24.4" | 649 | |
| | | Ambuquí | GAb1 | N 00°27'20.8" W 78°00'40.8" | 1655 |
| | GAb2 | | N 00°25'20.9" W 78°00'41.1" | 1680 | |
| | GAb3 | | N 00°27'15.8" W 78°00'34.1" | 1684 | |
| | Peña Negra | GPN1 | N 00°45'44.8" W 78°15'50.5" | 923 | |
| | | GPN2 | N 00°45'44.5" W 78°15'51" | 923 | |
| | | GPN3 | N 00°47'03.5" W 78°16'54.5" | 892 | |
| | PICHINCHA | Nanegalito | GNan1 | N 00°03'14.8" W 78°40'58.2" | 1556 |
| GNan2 | | | N 00°04'32.9" W 78°41'30.54" | 1691 | |
| GNan3 | | | N 00°02'09.4" W 78°43'03.9" | 1762 | |
| Pedro Vicente Maldonado | | GPV1 | N 00°05'48.3.0" W 79°04'4098" | 579 | |
| | | GPV2 | N 00°06'01.0" W 79°05'53.7" | 541 | |
| | | GPV3 | N00°05'59.8" W 79°06'46.8" | 513 | |
| Pifo | | GPI1 | S 00°12'44.9" W 78°22'35.5" | 2452 | |
| TUNGURAHUA | Patate | GPa1 | S 01°18'26.9" W 78°31'16.1" | 2109 | |
| | | GPa2 | S 01°18'50.3" W 78°30'47.1" | 2192 | |
| | | GPa3 | S 01°19'44.1" W 78°30'27.0" | 2062 | |
| | Agoyan | GAg1 | S 01°23'55.4" W78°21'59.6" | 1660 | |
| | | GAg2 | S 01°23'49.6" W 78°21'13.0" | 1695 | |
| | | Rio Verde | GRV1 | S 01°24'11.6" W 78°18'24.9" | 1550 |
| | GRV2 | | S 01°24'11.3" W 78°18'13.6" | 1537 | |
| | GRV3 | | S 01°24'01.7" W 78°17'44.7" | 1534 | |
| | Paute | GPt1 | S 02°46'17.6" W 78°45'04.00" | 2179 | |
| | | GPt2 | S 02°46'18.8" W 78°45'04.4" | 2180 | |
| | Santa Isabel | GSI1 | S 03°16'59.3" W 79°18'58.4" | 1497 | |
| | | GSI2 | S 03°18'33.0" W 79°20'58.8" | 1408 | |
| | AZUAY | La Victoria | GLV1 | S 03°47'22.4" W 80°02'51.4" | 415 |
| | | | GLV2 | S 03°47'29.1" W 80°02'54.0" | 403 |
| | | | GLV3 | S 03°47'20.5" W 80°03'04.4" | 417 |
| EL ORO | Pasaje | GPJ1 | S 03°19'20.6" W 79°50'03.9" | 22 | |
| | | GPJ2 | S 03°18'37.6" W 79°48'03.8" | 44 | |
| | | GPJ3 | S 03°18'46.8" W 79°47'05.1" | 40 | |
| | | GPJ4 | S 03°17'52.4" W 79°48'22.4" | 30 | |
| | | GPJ5 | S 03°17'21.1" W 79°49'02.3" | 17 | |
| | Santa Rosa | GSRO1 | S 03°27'15.5" W 79°58'41.1" | 11 | |
| | | GSRO2 | S 03°32'20.5" W 80°01'14.0" | 35 | |
| | | GSRO3 | S 03°31'42.1" W 80°01'29.2" | 28 | |
| | | GSRO4 | S 03°34'05.4" W 80°02'32.4" | 41 | |
| | | GSRO5 | S 03°33'54.5" W 80°03'28.7" | 64 | |

| | | | | |
|--------|------------|-----------|-----------------------------|------|
| LOJA | Huaquillas | GHU1 | S 03°29'20.9" W 80°12'41.8" | 12 |
| | | GHU2 | S 03°29'02.8" W 80°12'41.1" | 17 |
| | | GHU3 | S 03°29'00.2" W 80°13'04.8" | 12 |
| | Saracay | GSY1 | S 03°38'42.9" W 79°51'42.6" | 160 |
| | | GSY2 | S 03°38'49.8" W 79°51'17.5" | 180 |
| | | GSY3 | S 03°38'57.0" W 79°50'57.0" | 174 |
| | Zaruma | GZM1 | S 03°41'17.2" W 79°36'58.1" | 1141 |
| | | GZM2 | S 03°41'21.6" W 79°36'42.0" | 1270 |
| | | GZM3 | S 03°41'23.7" W 79°36'48.0" | 1236 |
| | | GZM4 | S 03°41'47.2" W 79°37'17.0" | 955 |
| | Cotacocha | GCOT1 | S 04°02'27.4" W 79°38'11.8" | 1703 |
| | | GCOT2 | S 04°02'25.8" W 79°38'11.0" | 1699 |
| | Alamo | GAL1 | S 04°01'18.9" W 79°59'16.4" | 1150 |
| | | GAL2 (Ar) | S 04°01'09.3" W 80°01'21.7" | 1325 |
| | | GAL3 | S 04°01'11.2" W 80°01'29.8" | 1266 |
| | | GAL 4 | S 04°01'04.8" W 80°01'49.3" | 1205 |
| | Zapotillo | GZP1 | S 04°23'11.1" W 80°14'35.1" | 193 |
| | | GZP2 | S 04°23'16.1" W 80°14'42.7" | 176 |
| | | GZP3 | S 04°23'16.1" W 80°14'43.2" | 176 |
| | Macará | GMAC1 | S 04°22'41.3" W 79°56'35.1" | 473 |
| | | GMAC2 | S 04°23'17.6" W 79°57'39.0" | 412 |
| | | GMAC3 | S 04°21'42.7" W 79°56'10.9" | 512 |
| | Cariamanga | GCG1 | S 04°20'14.5" W 79°35'40.5" | 1818 |
| | | GCG2 | S 04°19'18.7" W 79°38'56.7" | 2039 |
| | | GCG3 | S 04°19'39.0" W 79°38'28.9" | 1937 |
| | | GCG4 | S 04°19'50.5" W 79°37'33.4" | 1889 |
| | Catamayo | GCT1 | S 04°02'08.7" W 79°22'43.0" | 1174 |
| | | GCT2 | S 03°59'30.4" W 79°21'42.9" | 1253 |
| | | GCT3 | S 03°58'24.7" W 79°22'32.5" | 1252 |
| | | GCT4 | S 03°58'45.1" W 79°22'01.9" | 1245 |
| | Vilcabamba | GVI1 | S 04°15'07.1" W 79°13'52.0" | 1500 |
| | | GVI2 | S 04°15'53.9" W 79°13'29.7" | 1599 |
| | | GVI3 | S 04°15'20.3" W 79°13'21.1" | 1544 |
| ZAMORA | Valladolid | GVD1 | S 04°32'54.5" W 79°07'52.8" | 1603 |
| | | GVD2 | S 04°33'09.8" W 79°07'57.8" | 1596 |
| | | GVD3 | S 04°33'10.5" W 79°07'59.5" | 1598 |
| | Cumbaratze | GCZ1 | S 03°59'40.5" W 78°52'04.3" | 875 |
| | | GCZ2 | S 03°59'40.3" W 78°51'56.1" | 876 |
| | | GCZ3 | S 03°59'29.4" W 78°51'59.6" | 912 |
| | Palanda | GPD1 | S 04°39'06.9" W 79°07'54.0" | 1151 |

| | | | | | |
|------------|---------------|----------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| | Zamora | GPD2 | S 04°38'52.1" W 79°07'53.0" | 1145 | |
| | | GPD3 | S 04°38'57.6" W 79°08'00.5" | 1158 | |
| | | GZR1 | S 04°02'31.3" W 78°59'47.8" | 1102 | |
| | | GZR2 | S 04°02'46.9" W 78°59'12.3" | 1027 | |
| | | GZR3 | S 04°02'39.2" W 78°59'18.9" | 1015 | |
| | | GZR4 | S 04°03'35.1" W 78°57'58.4" | 997 | |
| | Yantzaza | GYZ1 | S 03°50'56.9" W 78°45'43.0" | 827 | |
| | | GYZ2 | S 03°50'28.6" W 78°45'40.8" | 830 | |
| | | GYZ3 | S 03°49'07.8" W 78°45'29.9" | 811 | |
| | | GYZ4 | S 03°49'01.9" W 78°45'26.3" | 811 | |
| | MORONA | Gualaquiza | GGU1 | S 03°29'58.5" W 78°21'0.1" | 801 |
| | | | GGU2 | S 03°25'16.1" W 78°34'17.4" | 817 |
| | | | GGU3 | S 03°24'54.0" W 78°34'28.0" | 834 |
| | | San Juan Bosco | GBC1 | S 03°09'35.6" W 78°32'52.5" | 1589 |
| GBC2 | | | S 03°08'30.1" W 78°32'21.6" | 1320 | |
| GBC3 | | | S 03°07'29.8" W 78°31'57.0" | 1101 | |
| Macas | | GMS1 | S 02°22'42.9" W 78°09'51.9" | 950 | |
| | | GMS2 | S 02°21'25.9" W 78°09'21.9" | 962 | |
| | | GMS3 | S 02°19'34.1" W 78°08'19.4" | 954 | |
| ESMERALDAS | La Unión | GLU1 | N 00°10'07.7" W 79°23'42.7" | 157 | |
| | | GLU2 | N 00°12'34.2" W 79°24'27.4" | 138 | |
| | Cube | GCU1 | N 00°34'13.3" W 79°34'01.0" | 71 | |
| | | GCU2 | N 00°35'17.2" W 79°33'36.0" | 64 | |
| | | GCU3 | N 00°36'54.5" W 79°33'12.3" | 75 | |
| | San Mateo | GSM1 | N 00°53'45.2" W 79°39'57.8" | 51 | |
| | | GSM2 | N 00°53'04.5" W 79°39'32.7" | 129 | |
| | | GSM3 | N 00°52'23.9" W 79°39'05.2" | 54 | |
| | SANTO DOMINGO | Valle Hermosa | GVH1 | S 00°06'17.4" W 79°17'07.5" | 339 |
| GVH2 | | | S 00°06'35.8" W 79°16'30.7" | 400 | |
| Alluriquín | | GALL1 | S 00°18'54.7" W 79°02'00.7" | 720 | |
| | | GALL2 | S 00°18'51.8" W 78°58'27.7" | 754 | |
| MANABI | El Carmen | GECA1 | S 00°16'10.1" W 79°32'07.3" | 170 | |
| | | GECA2 | S 00°16'24.2" W 79°33'52.7" | 180 | |
| | | GECA3 | S 00°16'13.7" W 79°34'46.2" | 191 | |
| | Chone | GCHO1 | S 00°41'33.7" W 80°03'49.5" | 9 | |
| | | GCHO2 | S 00°42'22.9" W 80°09'27.1" | 8 | |
| | | GCHO3 | S 00°43'56.4" W 80°11'01.8" | 3 | |
| | Montecristi | GMC1 | S 01°02'43.7" W 80°39'18.1" | 100 | |
| | | GMC2 | S 01°03'14.9" W 80°39'49.6" | 246 | |
| | Puerto López | GPLm1 | S 01°32'23.8" W 80°48'06.6" | 9 | |

| | | | | |
|-------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|------|
| | | GPLm2 | S 01°33'45.3" W 80°48'45.2" | 23 |
| SANTA ELENA | Manglar Alto | GMAL1 | S 01°50'51.4" W 80°44'41.1" | 17 |
| | | GMAL2 | S 01°50'59.1" W 80°44'35.1" | 16 |
| | | GMAL3 | S 01°52'54.1" W 80°44'04.7" | 8 |
| | | | | |
| GUAYAS | Nobol | GNO1 | S 01°55'14.9" W 80°00'49.7" | 21 |
| | | GNO2 | S 01°54'42.9" W 80°01'15.8" | -11 |
| | | GNO3 | S 01°53'03.9" W 80°00'29.5" | 8 |
| | Palestina | GPL1 | S 01°37'00.2" W 79°58'33.7" | 28 |
| | | GPL2 | S 01°37'26.4" W 79°58'40.4" | 19 |
| | Balzar | GBA1 | S 01°23'07.0" W 79°54'33.9" | 38 |
| GBA2 | | S 01°23'07.2" W 79°54'38.0" | 33 | |
| LOS RIOS | Vinces | GVC1 | S 01°33'44.6" W 79°45'48.5" | 34 |
| | | GVC2 | S 01°34'21.9" W 79°44'32.4" | 36 |
| | Pueblo Viejo | GPVJ1 | S 01°32'54.6" W 79°31'41.8" | 37 |
| | | GPVJ2 | S 01°34'09.5" W 79°29'36.5" | 29 |
| BOLIVAR | Caluma | GCL1 | S 01°37'42.6" W 79°17'17.3" | 297 |
| | | GCL2 | S 01°37'45.1" W 79°16'59.1" | 319 |
| | | GCL3 | S 01°37'50.1" W 79°16'28.7" | 329 |
| | Echandía | GECH1 | S 01°29'30.9" W 79°09'21.6" | 1335 |
| | | GECH2 | S 01°29'31.2" W 79°09'20.2" | 1336 |

Anexo B Individuos seleccionados para el proceso de amplificación, para cada muestra se indica los resultados de la cuantificación de ADN utilizando NanoDrop.

| Provincia | Localidad | Nombre muestra | Concentración (ng/μl) | A _{260/280} | A _{260/230} |
|-----------|------------------|----------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| Napó | Carlos Arosemena | GCa2 | 955,4 | 1,99 | 1,5 |
| | | GCa3 | 942,6 | 1,92 | 1,63 |
| | Misahuallí | GMi2 | 694,2 | 2,08 | 1,22 |
| | Nerupa | GNp1 | 535,3 | 2,12 | -55,43 |
| | Borja | GBj2 | 428 | 2,15 | 141,02 |
| SUCUMBÍOS | Shushufindi | GShu1 | 268,4 | 2,22 | -17,54 |
| | Santa Cecilia | GSCe2 | 419,7 | 2,19 | -145,44 |
| | | GSCe3 | 586,7 | 2,09 | -14,39 |
| | Gonzalo Pizarro | GGp2 | 506,8 | 1,92 | -4,22 |
| | | GGp3 | 309,8 | 2,11 | -7,53 |
| LORETO | Loreto | GLo2 | 468,9 | 1,88 | 1,58 |
| | | GLo3 | 454,6 | 1,81 | 1,31 |

| | | | | | |
|-----------|-------------|-------|--------|------|------|
| | Macarena | GMa1 | 568,7 | 1,88 | 1,69 |
| | | GMa2 | 634,6 | 1,8 | 1,57 |
| | | GMa3 | 569 | 1,83 | 1,6 |
| PASTAZA | Shell | GSh1 | 1022,9 | 1,93 | 1,64 |
| | | GSh2 | 816,2 | 1,94 | 1,23 |
| | | GSh3 | 879 | 1,92 | 1,41 |
| | Santa Clara | GSC1 | 1154,9 | 1,94 | 1,6 |
| | | GSC3 | 1258,9 | 1,93 | 1,61 |
| | | | | | |
| IMBABURA | Lita | GLi2 | 1799,2 | 2,08 | 1,5 |
| | | GLi3 | 2042,2 | 1,91 | 1,13 |
| | Ambuquí | GAb1 | 1245,9 | 1,96 | 1,56 |
| | | GAb3 | 1000,3 | 1,96 | 1,23 |
| | Peña Negra | GPn3 | 708,4 | 1,9 | 1,43 |
| PICHINCHA | Nanegalito | GNan1 | 484 | 1,86 | 1,18 |

| | | | | | |
|------------|---------------|-------|--------|------|------|
| TUNGURAHUA | | GNan2 | 377,5 | 1,98 | 1,75 |
| | Pedro Vicente | GPV2 | 941,2 | 2,05 | 1,61 |
| | Guayllabamba | GGua1 | 1997,8 | 2,03 | 1,26 |
| | | | | | |
| | Patate | GPa1 | 675,9 | 1,96 | 1,51 |
| | | GPa3 | 2399 | 2 | 1,94 |
| | Agoyan | GAg1 | 1727 | 1,88 | 1,27 |
| | Río Verde | GRV2 | 1553,3 | 1,97 | 1,75 |
| | | | | | |
| | | GRV3 | 686 | 1,91 | 1,63 |
| AZUAY | Paute | GPt1 | 1127,4 | 2,02 | 1,68 |
| | | GPt2 | 1321,4 | 1,98 | 1,35 |
| | Santa Isabel | GSi1 | 1360 | 1,8 | 1,12 |
| | | GSi2 | 724,7 | 2,12 | 0,91 |
| | La Victoria | GLV1 | 383,3 | 1,94 | 1,58 |
| | | | | | |
| EL ORO | Pasaje | GPJ1 | 1009,3 | 1,9 | 1,63 |

| | | | | | | |
|-----------|------------|-----------|--------|--------|------|------|
| | | GPI2 | 2012,1 | 1,93 | 1,63 | |
| | Santa Rosa | GSRO1 | 786,5 | 1,85 | 1,3 | |
| | | GSRO5 | 704,8 | 1,95 | 1,48 | |
| | Huaquillas | GHU1 | 1387,9 | 1,85 | 1,2 | |
| | | GHU3 | 3966 | 2,03 | 2,09 | |
| | Saracay | GSY2 | 775,9 | 1,86 | 1,36 | |
| | | GSY3 | 543,2 | 1,88 | 1,31 | |
| | Zaruma | GZM2 | 1592,6 | 1,87 | 1,23 | |
| | | GZM3 | 1032 | 1,99 | 1,77 | |
| | LOJA | Cotacocha | GCOT1 | 819,3 | 1,79 | 1,11 |
| | | Álamo | GAL2 | 1823,4 | 2,02 | 1,73 |
| | | | GAL3 | 1167,7 | 1,96 | 1,58 |
| Zapotillo | | GZP1 | 1444,6 | 1,74 | 0,97 | |
| Macará | | GMAC3 | 892,2 | 1,95 | 1,46 | |

| | | | | | |
|------------|---------------------|------------|--------|--------|------|
| | Cariamanga | GCG2 | 1530,1 | 1,9 | 1,47 |
| | | GCG4 | 2990,6 | 1,85 | 1,25 |
| | Catamayo | GCT1 | 1015,1 | 2,06 | 1,37 |
| | | GCT3 | 895,2 | 1,75 | 1,11 |
| | Vilcabamba | GVI2 | 2391,2 | 1,93 | 1,56 |
| | ZAMORA CHINCHIPE | Valladolid | GVD2 | 1234,6 | 1,9 |
| Cumbaratze | | GCZ2 | 768 | 1,96 | 1,39 |
| Palanda | | GPD1 | 2310,5 | 1,93 | 1,49 |
| Zamora | | GZR1 | 1407,9 | 1,9 | 1,62 |
| | | GZR4 | 1465 | 2 | 1,1 |
| Yantzaza | | GYZ3 | 984 | 2,02 | 1,72 |
| Gualaquiza | | GGU1 | 823,1 | 2,05 | 1,39 |
| | GGU3 | 1061,8 | 2 | 1,54 | |

| | | | | | |
|-----------------|----------------|---------------|--------|-------|------|
| MORONA SANTIAGO | San Juan Bosco | GBC2 | 477,3 | 1,81 | 1,05 |
| | Macas | GMS3 | 322,8 | 1,83 | 1,16 |
| ESMERALDAS | La Unión | GLU1 | 564,2 | 2,08 | 1,38 |
| | | GLU2 | 487,7 | 1,99 | 1,62 |
| | Cube | GCU2 | 639,3 | 1,95 | 1,74 |
| | | GCU3 | 1321,2 | 2,08 | 1,31 |
| | San Mateo | GSM1 | 583,8 | 2,06 | 1,5 |
| | SANTO DOMINGO | Valle Hermosa | GVH1 | 144,6 | 2,11 |
| GVH2 | | | 198 | 2 | 0,82 |
| Alluriquin | | GALL1 | 388,2 | 1,89 | 1,49 |
| | | GALL2 | 390,3 | 2,26 | 0,91 |
| MANABÍ | El Carmen | GECA2 | 2281,2 | 1,96 | 1,76 |
| | Chone | GCHO1 | 4860,6 | 2,02 | 1,77 |
| | | GCHO2 | 1049,2 | 1,94 | 1,46 |

| | | | | | |
|-------------|--------------|-------|--------|------|------|
| | Montecristi | GMC1 | 1905,7 | 1,9 | 1,37 |
| | Puerto Lopez | GPLm1 | 1096,2 | 2,01 | 1,64 |
| SANTA ELENA | Manglar Alto | GMAL3 | 1650 | 1,93 | 1,61 |
| GUAYAS | Nobol | GNO3 | 969,5 | 1,96 | 1,54 |
| | Palestina | GPL1 | 641,6 | 1,91 | 1,53 |
| | Balzar | GBA1 | 1090,3 | 1,87 | 1,69 |
| | | GBA2 | 544,2 | 1,91 | 1,58 |
| LOS RÍOS | Vinces | GVC1 | 717,7 | 1,84 | 1,43 |
| | | GVC2 | 1904,8 | 1,96 | 1,83 |
| | Pueblo viejo | GPVJ1 | 726,1 | 1,89 | 1,55 |
| | | GPVJ2 | 542,7 | 1,81 | 1,21 |
| BOLÍVAR | Caluma | GCL2 | 1186,4 | 2,09 | 1,58 |
| | | GCL3 | 647,1 | 1,99 | 1,21 |
| | Echandía | GECH1 | 1049 | 2,07 | 1,41 |

| | | | | | |
|--|--|-------|-------|------|------|
| | | GECH2 | 276,8 | 2,04 | 1,63 |
|--|--|-------|-------|------|------|