

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional
del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) en la sierra
ecuatoriana**

Proyecto de investigación

Pamela Katherine Vega Polo

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 23 de mayo de 2019

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

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño
(*Vaccinium floribundum* Kunth.) en la sierra ecuatoriana**

Pamela Katherine Vega Polo

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:

Pamela Katherine Vega Polo

Código:

00125927

Cédula de Identidad:

1717343154

Lugar y fecha:

Quito, 23 de mayo de 2019

Dedicatoria

Dedico este logro a mis padres quienes me dieron la oportunidad de seguir esta carrera y me han apoyado a lo largo de todo el camino permitiéndome vivir nuevas experiencias y crecer dentro de este campo. Gracias por todo su cariño, por ser mis mejores guías, mi mejor ejemplo, y enseñarme a ser mejor cada día.

Agradecimientos

A mis padres por apoyarme y siempre estar conmigo a lo largo de todo mi camino, entenderme y alentarme a seguir adelante. Todos mis logros se los agradezco a ustedes. También a mi familia, mis abuelitos, mis ñaños, y mis primos, quienes siempre estuvieron pendientes de mi avance.

A mis profesores, especialmente a María de Lourdes Torres quien me dio la oportunidad de realizar este trabajo y me apoyó a lo largo del camino abriéndome puertas y brindándome oportunidades. A Bernardo Gutiérrez, María Mercedes Cobo y Estefanía Rojas quienes fueron mis guías en diferentes etapas de este proyecto, y supieron aconsejarme, y transmitirme amplios conocimientos para el desarrollo del mismo.

A Andrea Argudo y Diego Urquía por el apoyo y los conocimientos que me supieron brindar, además de siempre estar ahí para responder mis dudas. A Darío Ramírez y Andrea Pinos, quienes son parte de este proyecto y con su ayuda me permitieron desarrollarlo.

A Mateo Flores, quien me ha acompañado en gran parte de mi carrera universitaria, y ha sabido apoyarme y aconsejarme. Y a mis amigos de la carrera, y del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Ricky, Nathi y Sofi, con los que empecé este camino y con los que lo estoy culminando.

Finalmente quiero agradecer a la Universidad San Francisco de Quito por otorgarnos el *Collaboration Grants* para el financiamiento del proyecto.

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) es un arbusto silvestre, endémico de la región andina, que se distribuye en los ecosistemas de altura de Venezuela hasta Bolivia. En Ecuador, se encuentra en los páramos, y es principalmente reconocido por sus frutos comestibles en forma de baya, de alto valor cultural. Estos presentan un alto contenido de compuestos bioactivos como polifenoles y antocianinas que están asociados a diferentes propiedades terapéuticas. Hasta el momento, la especie no ha podido ser domesticada y el ecosistema en el que habita se ve afectado por actividades antropogénicas. Se ha reportado que la fragmentación de los páramos de la región andina afecta directamente a la diversidad de las especies, por lo que el mortiño podría estar en una situación de vulnerabilidad. Los estudios de la diversidad genética de esta especie se han limitado a tres provincias en el norte de la sierra ecuatoriana. Con el fin de tener una mejor comprensión del estado de la especie, este estudio tuvo como objetivo analizar la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño en las diez provincias de la sierra ecuatoriana mediante el uso de dieciséis marcadores microsatélites homólogos. Se identificó un total de 179 alelos, con un promedio de 11.2 alelos por locus. La heterocigosidad esperada global de 0.73 reveló una diversidad genética moderadamente alta para el mortiño en Ecuador. El análisis de variación molecular demostró que el 70% de la variabilidad genética se encontró dentro de las poblaciones, y el 30% entre las poblaciones. Por otro lado, se identificó una estructura poblacional definida por cuatro clústers genéticos, mediante análisis de agrupamientos multivariados e inferencia bayesiana. El primero compuesto por individuos del norte de la región (desde Carchi hasta Cotopaxi), el segundo por individuos del centro (desde Cotopaxi hasta Chimborazo), y el tercero por individuos del sur (Cañar y Loja). El cuarto agrupó de manera independiente a los individuos de Quilotoa en Cotopaxi, y de Azuay. Este último clúster presentó un flujo genético bajo con respecto a los demás clústers. Los patrones de estructura poblacional encontrados podrían explicarse por algunos hechos históricos de la región andina como las fluctuaciones climáticas en el Pleistoceno, o la diferencia entre suelos volcánicos y metamórficos. Por otro lado, el clúster de Quilotoa y Azuay podría explicarse por la posible adaptación de estos individuos a mayores altitudes, hipótesis que requiere de mayor análisis para poder sustentarla.

Este estudio es el primero en reportar la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño a lo largo de la sierra ecuatoriana. Los resultados obtenidos pueden ser la base para el desarrollo de programas de conservación para un manejo adecuado de este importante recurso biológico, y para la conservación de los ecosistemas en los que habita.

Abstract

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) is a wild shrub endemic to the Andean region and is distributed in high altitude ecosystems from Venezuela to Bolivia. In Ecuador, it is found in tundra-like ecosystems (commonly referred to as paramos) and is mainly recognized for its edible berry-shaped fruits of high cultural value. These contain a high content of bioactive compounds such as polyphenols and anthocyanins, which are associated with different therapeutic properties. Until now the species has not been domesticated, and the ecosystem in which it is found has been altered by anthropogenic activities. Therefore, mortiño could be in a situation of vulnerability since it has been reported that the fragmentation of the paramos of the Andean region is directly affecting the diversity of species. Studies of the genetic diversity of mortiño are limited to three provinces in northern Ecuadorian Highlands. Thus, in order to have a better understanding of the status of the species, this study aimed to analyze its genetic diversity and population structure in the ten provinces of the Ecuadorian Highlands, using sixteen homologous microsatellite markers. A total of 179 alleles were identified with an average of 11.2 alleles per locus. The expected global heterozygosity of 0.73 revealed a moderately high genetic diversity. Analysis of molecular variance showed that 70% of genetic variability was found within populations, and 30% among populations. On the other hand, a population structure defined by four genetic clusters was identified, through multivariate clustering analysis and bayesian inference. The first cluster was composed by individuals from the north of the region (from Carchi to Cotopaxi), the second by individuals from the center (from Cotopaxi to Chimborazo), and the third by individuals from the south (Cañar and Loja). The fourth cluster grouped independently and was composed of individuals from Quilotoa and Azuay. This last cluster presented a low genetic flow in relation to the other clusters. The population structure found in this study could be explained by some historical facts of the Andean region such as climatic fluctuations in the Pleistocene, or the difference between volcanic and metamorphic soils. The genetic cluster found in the Quilotoa and Azuay individuals could be explained by the possible adaptation of these individuals to higher altitudes, a hypothesis that requires further analysis.

This study is the first one that reports the genetic diversity and population structure of mortiño along the Ecuadorian highlands. The results obtained could be the basis for the development of conservation programs for the paramos and the mortiño. In this way this project can contribute to the proper management of this important biological resource.

Tabla de Contenido

1.	Introducción.....	15
1.1.	Género <i>Vaccinium</i>	15
1.1.1.	Historia, origen y distribución.....	15
1.1.2.	Taxonomía del Género	16
1.1.3.	Importancia Económica.....	17
1.2.	Especie <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth. Mortiño.....	17
1.2.1.	Generalidades y Distribución	17
1.2.2.	Usos y Propiedades.....	18
1.2.3.	Situación Actual en Ecuador	19
1.3.	Afectación de la biodiversidad por la fragmentación de los páramos en la región Andina ¹⁹	
1.4.	Diversidad Genética	20
1.5.	Marcadores Moleculares	21
1.5.1.	Microsatélites	22
1.5.2.	Aplicaciones de los Microsatélites	23
2.	Objetivos.....	24
2.1.	Objetivo General	24
2.2.	Objetivos Específicos	24
3.	Justificación.....	25
4.	Área de estudio.....	26
5.	Materiales	26

5.1.	Colección de muestras de mortiño	26
5.2.	Extracción de ADN a partir de hojas de mortiño	27
5.3.	Cuantificación y dilución del ADN	27
5.4.	Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR.....	27
5.5.	Electroforesis en geles de agarosa	28
5.6.	Genotipado de regiones microsatélites SSR amplificadas	28
5.7.	Análisis de datos.....	29
6.	Métodos	29
6.1.	Obtención de material vegetal	29
6.2.	Extracción y cuantificación de ADN de mortiño	30
6.3.	Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites	31
6.4.	Genotipado	32
6.5.	Análisis de diversidad genética del mortiño.....	32
6.5.1.	Análisis de la diversidad genética	32
6.5.2.	Distribución de la diversidad genética	33
6.6.	Análisis de la estructura poblacional del mortiño	33
7.	Resultados.....	34
7.1.	Colección de muestras de mortiño, extracción y cuantificación de ADN.....	34
7.2.	Amplificación y genotipado de regiones microsatélites con primers homólogos ...	35
7.3.	Análisis de datos.....	35
7.3.1.	Diversidad genética del mortiño en la sierra ecuatoriana.....	35

7.3.2. Distribución de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional

36

8.	Discusión	39
8.1.	Colección de muestras de mortiño y extracción de ADN	39
8.2.	Amplificación y genotipado de regiones microsatélites con primers homólogos ...	39
8.3.	Diversidad genética del mortiño en la sierra ecuatoriana.....	40
8.4.	Distribución de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional ..	43
9.	Conclusiones.....	48
10.	Recomendaciones	49
11.	Referencias	50
12.	Tablas	65
13.	Figuras	68
14.	Anexos	75

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de la información proporcionada por 16 marcadores SSR para la caracterización genética del mortiño a lo largo de la Sierra Ecuatoriana.	65
Tabla 2. Resumen de los parámetros de diversidad para cada localidad en donde se recolectaron individuos de mortiño.	66
Tabla 3. Comparación de los valores pairwise Fst entre las cuatro regiones analizadas.....	67
Tabla 4. Comparación de los valores pairwise Fst entre las 4 localidades encontradas dentro de la región 4.....	67
Tabla 5. Valores para estimación del K óptimo a partir del análisis en STRUCTURE con información previa de localidad y provincia de origen de las muestras de mortiño.....	67

Índice de Figuras

- Figura 1.** Mapa georreferenciado de las 27 localidades de la sierra ecuatoriana (puntos naranjas) en donde se recolectaron las muestras de mortiño analizadas en este estudio. Elaborado por Izán Chalén. 68
- Figura 2.** Electroforesis en gel agarosa al 1% de muestras de ADN extraído a partir de hojas de mortiño de Cotopaxi. Dentro del cuadro blanco se observan bandas de ADN de alto peso molecular en todas las muestras. Ladder: 100 bp (Invitrogen)..... 69
- Figura 3.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) representada en función de la distribución de la diversidad genética del mortiño entre poblaciones (interpoblacional) y dentro de las poblaciones (intrapoblacional). La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos entre las 27 localidades muestreadas. La variación genética dentro de las poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos dentro de que cada localidad muestreada. 69
- Figura 4.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) bidimensional, de 100 individuos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) utilizando datos de diversidad genética de 16 marcadores SSR. Se sugieren 4 posibles clústers genéticos que están representados en color rojo (individuos del norte de la sierra ecuatoriana), amarillo (individuos del centro), azul (individuos del sur) y verde (individuos de Quilotoa y localidades de Azuay)..... 70
- Figura 5.** Dendrograma Neighbor Joining (NJ) por localidades de muestreo de individuos de *V. floribundum* en la sierra ecuatoriana. El dendrograma NJ representa a través de la longitud de las ramas, las distancias genéticas halladas entre los individuos de las distintas localidades. 71
- Figura 6.** Ilustración de los cuatro clústers (regiones) en los que el DAPC agrupó a los individuos de *V. floribundum* muestreados en la sierra ecuatoriana. Cada punto representa a un individuo, y cada elipse y color representa un clúster. Los DA eigenvalues (3) indican la relación entre y dentro de la varianza de los componentes principales (PC), utilizando combinaciones lineales. 71
- Figura 7.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro de la región 4, representada en función de la distribución de la diversidad genética del mortiño entre poblaciones (interpoblacional) y dentro de las poblaciones (intrapoblacional). La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos entre las 4 localidades de la región 4 (Quilotoa, Toreadora, Cajas y Cruces). La variación genética dentro de las

- poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos dentro de cada una de las 4 localidades. 72
- Figura 8.** Q-plot que muestra el agrupamiento bayesiano de 100 individuos ($K = 4$). El valor K es el número de acervos representados por diferentes colores. Rojo: grupo norte; amarillo: grupo centro; azul: grupo sur; y verde: grupo altitudinal. 72
- Figura 9.** Red de migración entre las cuatro regiones analizadas. La proximidad de los círculos es directamente proporcional a la similitud genética de las regiones. Las líneas de conexión reflejan la magnitud relativa y la dirección de la migración y el flujo génico entre las regiones. Valores cercanos a 1 y líneas más oscuras se asocian a mayores niveles de flujo génico. 73
- Figura 10.** Gráfico de dispersión para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de cada par de individuos de mortiño de la muestra en estudio, mediante una prueba de Mantel pareada. rxy: coeficiente de correlación. P: significancia. 73
- Figura 11.** Individuos de mortiño muestreados en el estudio. En la primera imagen (izquierda) se muestra una planta de mortiño rastrera, desarrollada a la misma altura que el pajonal, en el Parque Nacional Cajas. En la segunda imagen (derecha) se presenta un arbusto de mortiño con frutos, en el Parque Nacional Cotopaxi. Fotografías tomadas por Andrea Pinos y Pamela Vega. 74

Índice de Anexos

Anexo A. Permisos de movilización obtenidos por el Ministerio del Ambiente (MAE) de las 10 provincias de la sierra ecuatoriana.....	75
Anexo B. Loci microsatélites empleados como marcadores moleculares en este estudio (Argudo, 2017).....	76
Anexo C. Localidades de los 100 individuos de <i>V. floribundum</i> incluidos en este estudio, que se colectaron en las salidas de campo entre mayo del 2017 a agosto del 2018. Se indican las coordenadas y la altitud (en msnm) de cada individuo recolectado.....	77
Anexo D . Genotipado de los 100 individuos de <i>V. floribundum</i> de la sierra ecuatoriana, seleccionados para este estudio. Se muestran los genotipos de los 16 loci microsatélites. Los diferentes alelos están denotados según su tamaño en pb y separados por un guion (“-”).	80
Anexo E. Cuantificación (ng/ul) del ADN extraído de los 100 individuos de mortiño analizados en este estudio.....	84
Anexo F. Zona de influencia de actividad volcánica antigua y reciente en Ecuador (Espinosa et al, 2018).	87
Anexo G. Genotipos de los 16 loci microsatélites de los individuos de <i>V. floribundum</i> de la región 4 (Quilotoa en Cotopaxi y Azuay). Los diferentes alelos están denotados según su tamaño en pb y separados por un guion (“-”).	88

1. Introducción

1.1. Género *Vaccinium*

1.1.1. Historia, origen y distribución

Vaccinium es un género de origen antiguo, reportándose microfósiles de hojas y restos de tallos de hace 23 millones de años, de la Era Terciaria, en el Mioceno (Camp, 1942; Matthews y Oviden, 1990). Pertenece a la familia Ericaceae, en la que las especies se presentan como plantas epífitas, arbustos terrestres y árboles (Lubby et al, 1991). *Vaccinium* está conformado por aproximadamente 450 especies, y se ha reportado como un género cosmopolita, con un rango natural que se extiende desde los trópicos hasta el ártico y abarca tanto el hemisferio oriental como el occidental (Lyrene, 1988). Es así como se lo puede encontrar en toda América, en Asia específicamente en la India, China y Japón, en Madagascar y finalmente en toda Europa. Del total de las especies descritas de este género, 40% son originarias del sudeste de Asia, 35% son nativas de América, y el 25% restante provienen de diferentes partes del mundo (Song y Hancock, 2010). Gran parte de las especies habitan en los trópicos, donde la mayoría crece en laderas abiertas de las montañas y en los páramos (Lubby et al, 1991). En el Neotrópico, la riqueza total de especies de *Vaccinium* se incrementa a medida que se acerca a la línea ecuatorial, siendo los Andes del sur de América la región con el mayor número y diversidad de especies del género (Luteyn, 2002).

En América, los frutos comestibles de las especies silvestres de *Vaccinium* han sido recolectados por miles de años por pueblos indígenas como fuente de alimento (Hummer, 2013; Luby et al, 1991). Dicha práctica fue heredada posteriormente por los inmigrantes europeos en el norte de América. Los mismos, establecieron los primeros cultivos de las especies *V. corymbosum* y *V. ashei* en el siglo XIX (Hancock et al, 2008). Los frutos eran extraídos de la naturaleza, y las semillas eran sembradas en campos localizados en Florida. Se escogía esta

zona por sus óptimas condiciones climáticas y nivel de acidez del suelo. Por otro lado, también se exportaron frutos y semillas a Inglaterra para el establecimiento de cultivos. Una vez que se logró tener una producción estable de frutos y semillas, estos fueron distribuidos al resto de los continentes (Moerman, 1998). En la actualidad, aún se conservan prácticas de recolección de frutos silvestres en Norteamérica con *V. ovalifolium* y *V. vitis-idaea*; Suramérica con *V. floribundum* y *V. meridionale*; y Europa con *V. Myrtillus* (Hancock et al, 2008; Nestby et al, 2011). Sin embargo, múltiples especies del género que presentan alto valor comercial por la calidad de sus frutos ya han sido domesticadas. Estas especies domesticadas son las que se cultivan mayormente en el norte de América y Europa (Brazelton, 2013; Song y Hancock, 2010).

1.1.2. Taxonomía del Género

El género *Vaccinium* se encuentra dentro del grupo de las angiospermas, y se compone principalmente de arbustos perennes. A nivel taxonómico, pertenece a la clase Magnoliopsida, dentro del orden Ericales, siendo uno de los géneros con mayor número de especies dentro de la familia Ericaceae (Galamb, 2004; Pedraza y Luteyn, 2011). Si bien Sleumer (1941) dividió el género en 33 secciones basándose en filogenética morfológica, debido al alto número de especies, la composición por secciones y las relaciones evolutivas han sido objeto de debate (Powell y Kron, 2002). Los análisis cladísticos moleculares han sugerido que es un género polifilético, dividido en dos subgéneros principales, *Vaccinium* y *Oxycoccus* (Kron et al, 2002).

El subgénero *Vaccinium* está compuesto por especies como *V. angustifolium*, *V. vitis-idaea*, *V. meridionale*, *V. floribundum*, entre otras. Las especies dentro de este subgénero se caracterizan por presentar tallos aéreos leñosos y gruesos. Por otro lado, el subgénero *Oxycoccus* presenta especies como *V. macrocarpon* y *V. oxycoccus*, conocidas también como arándanos rojos (“cranberries”), que presentan tallos leñosos rastreros y delgados (Jacquemart, 1998; Wilbur y Luteyn, 2008).

1.1.3. Importancia Económica

En general, los frutos de diferentes especies de *Vaccinium* son percibidos como un alimento que promueve la salud, por su gran cantidad de compuestos bioactivos y propiedades antioxidantes (Howell, 2008). Las especies de mayor importancia comercial se encuentran dentro de las secciones *Oxycoccus*, *Cyanococcus*, *Vitis-Idaea*, *Myrtillus* y *Vaccinium*. Por ejemplo, *V. corymbosum* es altamente valorada por la maduración temprana de sus frutos, *V. angustifolium* por su tolerancia a heladas, *V. macrocarpon* por su alto contenido de antioxidantes, y *V. vitis-idaea* por su alto contenido de ácidos orgánicos (Song y Hancock, 2010). Entre las especies del género, *V. corymbosum* (“highbush blueberry”) fue la primera en ser domesticada, es una de las más cultivadas y ha sido catalogada como la especie progenitora de la mayoría de las variedades cultivadas comercialmente (Brazelton y Strik, 2007; Hancock et al, 2008). La producción mundial total de esta especie supera las 650 millones de toneladas al año, con más de 65000 ha plantadas en Norteamérica, 23000 ha en Suramérica, 27000 ha en Asia y 16000 ha en Europa (Retamales y Hancock, 2018). Estados Unidos es el mayor productor e importador a nivel mundial con más de 240000 toneladas de frutos producidos anualmente (Brazelton y Young, 2017).

1.2. Especie *Vaccinium floribundum* Kunth. Mortiño

1.2.1. Generalidades y Distribución

Vaccinium floribundum Kunth., comúnmente conocido como mortiño, se caracteriza por ser un arbusto a subarbusto terrestre de 0.2 a 1.2 metros de alto. Las hojas son principalmente ovaladas-lanceoladas, coriáceas, dentadas; y presentan una coloración rosada cuando son jóvenes (Luteyn, 1996). La especie posee un tipo de inflorescencia axilar en racimo, compuesta de 6 a 10 flores tubulares de color púrpura y rosado. Las flores están orientadas en un mismo sentido, facilitando así su contacto con los polinizadores. El mortiño es reconocido por su fruto en forma de baya, de un color negro azulado tras su maduración.

Cada fruto presenta entre 45 a 60 semillas, de las cuales un gran porcentaje no alcanza un desarrollo completo (Chaparro y Becerra, 1999; Luteyn, 1996). Al igual que otras especies del mismo género, presenta una reproducción sexual por polinización cruzada y mayormente por autopolinización. Por otro lado, también presenta una reproducción asexual a través de estructuras leñosas, ubicadas en la zona de transición de raíces y brotes, que contienen yemas latentes de las cuales pueden brotar nuevos tallos (Luteyn, 2002).

El mortiño se encuentra en el sur de América, distribuido en los ecosistemas de altura de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia; en los bosques de neblina montanos, subpáramos, matorrales, pastizales en los páramos, y en bosques en transición (Luby et al, 1991). En Ecuador se encuentra distribuido en los páramos de la sierra, desde Carchi en el norte hasta Loja en el sur. Se ha reportado que crece entre los 1600 a 4200 msnm, en un rango de temperatura de 7 a 18°C. Sin embargo, soporta temperaturas de hasta 3°C que pueden presentarse en el superpáramo (Luteyn, 2002).

1.2.2. Usos y Propiedades

El mortiño es principalmente utilizado como un alimento funcional debido a que su fruto es comestible y presenta un alto contenido de compuestos bioactivos como polifenoles, antioxidantes, antocianinas y flavonoides (Llvisaca et al, 2018; Schreckinger et al, 2010; Vasco et al, 2009). El fruto generalmente es empleado para la elaboración de bebidas, helados, mermeladas, vinos y harinas (Moreta, 2016; Ortiz et al, 2013). Sin embargo, a pesar de ser utilizado principalmente por su sabor, los compuestos bioactivos presentes tanto en el fruto como en las hojas de la planta presentan un gran potencial etnobotánico. Diferentes estudios han reportado múltiples propiedades medicinales, principalmente como antioxidante, antiinflamatorio, antitumoral y antidiabético (Abreu et al, 2014; Alarcón et al, 2018; Lila, 2011; Llvisaca et al, 2018; Prencipe et al, 2014; Schreckinger et al, 2012). También, se han realizado

estudios respecto al efecto de sus antocianinas en la obesidad, reportándose que inhibe hasta en un 38% la acumulación lipídica en adipocitos (Schreckinger et al, 2010).

A la especie también se le atribuye un uso potencialmente ambiental y ecológico. En las comunidades se la utiliza para la recuperación de sitios quemados y páramos deforestados. Esto se debe a su alta capacidad de regeneración a partir de sus raíces y estructuras leñosas (De la Torre et al, 2008; Ramsay y Oxley, 1996). Por otro lado, el mortiño se ha identificado como una fuente potencial de genes de resistencia a heladas, dado las condiciones climáticas en las que se desarrolla (Ballington et al, 1993).

1.2.3. Situación Actual en Ecuador

En Ecuador, el mortiño es principalmente utilizado para la elaboración de la bebida tradicional del Día de los Difuntos, conocida como *colada morada* (Coba et al, 2012). Sin embargo, existen comunidades que han incursionado más allá en el uso de sus frutos, como en la parroquia de Sigchos, que es reconocida por la elaboración del vino de mortiño (MAGAP, 2016). Es una especie netamente silvestre, por lo que sus frutos se recolectan directamente de los páramos. Hasta la actualidad, la especie no ha sido domesticada ni cultivada, y se ha reportado que su propagación es problemática, siendo una de las razones la baja tasa de germinación de las semillas (Cobo et al, 2018; Chaparro y Becerra, 1999).

1.3. Afectación de la biodiversidad por la fragmentación de los páramos en la región

Andina

Los páramos de la región Andina son considerados un centro importante de diversidad y endemismo de especies. Sin embargo, en las últimas décadas se han encontrado bajo la presión de actividades humanas como la quema antropogénica y el pastoreo, causando una pérdida de hábitat generalizada y fragmentación (Astudillo et al, 2019). La fragmentación está asociada a la generación de parches de menor tamaño que admiten una menor diversidad y proveen un alto grado de aislamiento (Arellano y Rangel, 2010; Sala et al, 2000). Se ha

reportado que en la región Andina, la fragmentación de los páramos se está produciendo a un ritmo tal que, hoy en día, un gran porcentaje de las especies se encuentran bajo amenaza de desaparición (Armenteras, 2003).

Según la Lista Roja de la UICN diferentes especies del género *Vaccinium*, como *V. whimorei*, *V. cylandraceum* y *V. secundiflorum* se encuentran amenazadas por la fragmentación de sus ecosistemas (Maiz-Tome, 2016). En tal caso, dado a la creciente fragmentación de los páramos de la región Andina, el mortiño (*V. floribundum*) podría encontrarse como una especie bajo amenaza.

1.4. Diversidad Genética

La diversidad genética es la cantidad de variabilidad genética presente entre individuos de una población, y entre poblaciones, siendo la principal fuente de la biodiversidad (Bhargava y Carmona, 2012). Existen diferentes medidas para cuantificar la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población, como el número de alelos por locus, el número de genotipos por población, variantes dentro de una secuencia nucleotídica, variabilidad de características fenotípicas entre individuos por diferencias genéticas, entre otras (Hughes et al, 2008).

La diversidad genética es importante para el mantenimiento de la viabilidad y el potencial evolutivo o adaptativo de las poblaciones y especies (Frankham, 1995; Futuyma, 1986). Por tal razón, su estudio permite obtener información sobre el estado de una población dentro de un ecosistema específico. Por ejemplo, una población con mayor diversidad genética tiene mayor probabilidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales, enfermedades, competidores, entre otros (Hughes et al, 2008). En contraste, una población con menor diversidad genética se asocia a una menor probabilidad de supervivencia ante perturbaciones del medio ambiente, y por ende puede utilizarse como un indicador de la vulnerabilidad de una especie en un ecosistema específico (Bellard et al, 2012).

Por otro lado, la caracterización de la diversidad genética de una especie o población también es de gran interés en otros campos como en la agronomía. Por ejemplo, al conocerse las variaciones genotípicas relacionadas a características fenotípicas de interés, es posible desarrollar programas de selección asistida y mejoramiento genético (Hughes et al, 2008; Moose y Mumm, 2008).

1.5. Marcadores Moleculares

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN o loci genéticos que varían entre individuos de una misma población o especie. Estos loci pueden rastrearse y cuantificarse para determinar distintos genotipos en base al nivel de variación genética generada por mutaciones o alteraciones en las secuencias (Haq et al, 2016; Semagn y Ndjiondjop, 2006). Esto permite la identificación de genes de interés, así como la determinación de la diversidad genética de una población en base a los polimorfismos encontrados (Duran et al, 2009).

Los marcadores moleculares deben presentar ciertas características para ser empleados en análisis genéticos, como un alto nivel de polimorfismo, alta frecuencia de ocurrencia en el genoma, y fácil detección (Idrees e Irshad, 2014; Kumar et al, 2009). Por otro lado, deben ser codominantes y no epistáticos, permitiendo diferenciar entre individuos homocigotos y heterocigotos y evitando interacciones inter e intra locus (De Vienne, 2003; Holderegger et al, 2006).

Los polimorfismos en una secuencia pueden detectarse a través de diferentes técnicas, por lo que los marcadores se clasifican en: (i) marcadores basados en hibridación como los RFLP, (ii) en la amplificación de secuencias de ADN mediante PCR como los SSR, y (iii) en la secuenciación de productos de amplificación o genomas completos, como los SNPs (Haq et al, 2018; Kalia et al, 2011). Los primeros se basan en la hibridación de fragmentos de ADN digeridos por endonucleasas de restricción, a una sonda marcada; los polimorfismos se detectan a través de diferentes patrones de banda generados por mutaciones en los sitios de restricción

(Idrees e Irshad, 2014). Los marcadores basados en PCR utilizan cebadores que pueden diseñarse sobre la base de secuencias arbitrarias o secuencias específicas que flanquean el segmento de ADN que necesita ser amplificado. En este caso, los polimorfismos se detectan por patrones de banda generados al amplificar secuencias arbitrarias, o por la variación en las longitudes de las secuencias de loci amplificados (Gupta et al, 2002). Finalmente, los marcadores basados en secuenciación permiten detectar mutaciones en la secuencia, directamente asociadas a los polimorfismos encontrados (Haq et al, 2016).

1.5.1. Microsatélites

Los microsatélites son loci no codificantes constituidos por secuencias de 1 a 9 pares de bases repetidas en tándem a lo largo del genoma, que presentan una alta tasa de mutación por errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante el proceso de replicación (Karp, 2013). Debido a que el número de repeticiones varía dentro de una población, los microsatélites se han utilizado como marcadores moleculares para determinar los diferentes genotipos dentro de una población, y analizar las relaciones entre diferentes poblaciones (Haq et al, 2016). La variación del número de repeticiones se asocia a la obtención de diferentes tamaños de loci microsatélites en diferentes genotipos. Cada secuencia que se repite es un motivo, y el nivel de polimorfismo se puede analizar a través del tamaño de los alelos que varía en base a la eliminación o adición de motivos en la secuencia por deslizamiento de la polimerasa en la replicación (Vieira et al, 2016).

Entre los diferentes marcadores, los microsatélites han adquirido una importancia considerable en los análisis de la diversidad genética de especies vegetales. Son marcadores hipervariables, de naturaleza multialélica, herencia codominante, abundantes en el genoma, de alta reproducibilidad, y alta capacidad de automatización (Kalia et al, 2011). También, presentan estados alélicos neutros, que significa que no se ven afectados por la selección natural ni efectos fenotípicos (Hughes et al, 2008). Además, son marcadores de fácil

identificación mediante PCR, utilizando cebadores diseñados en base a las secuencias que flanquean los loci microsatélites; seguido de una electroforesis en gel desnaturizante, o electroforesis capilar, que permite separar los alelos y determinar su tamaño (Sittheret et al, 2014).

1.5.2. Aplicaciones de los Microsatélites

La identificación y caracterización de microsatélites permite analizar la diversidad genética de poblaciones naturales. Esto a su vez ayuda a establecer estrategias de conservación, domesticación, bancos de germoplasma, y programas de mejoramiento genético (Barcaccia, 2010). En plantas, son los marcadores preferidos debido a su naturaleza hipervariable y su extensa cobertura genómica. Se utilizan para el análisis de relaciones genéticas y evolutivas entre poblaciones, el mapeo y marcaje de genes o loci de rasgos cuantitativos (QTL) para caracteres agronómicos de interés, retrocruce asistido por marcadores en programas de reproducción, e identificación de género (Altukhov, 1995; Kalia et al, 2011).

Los marcadores microsatélites permiten analizar el estado de una especie dentro de un ecosistema, a través del estudio de la estructura de poblaciones, así como relaciones taxonómicas y filogenéticas (Arif et al, 2011). Por otro lado, también son útiles para analizar el flujo génico entre individuos de una misma población y entre poblaciones (Young, 1996).

Es así como estos marcadores han sido utilizados para determinar el grado de diversidad genética y estructura poblacional del mortiño. En el estudio realizado por Cobo et al (2016) se seleccionaron 11 marcadores microsatélites heterólogos de *V. corymbosum* para determinar la diversidad genética en tres provincias en el norte de la sierra ecuatoriana. Se reportó un grado moderado de diversidad genética ($H_e=0.49$) y una estructura poblacional representada en 3 regiones (Cobo et al, 2016). Debido a que el uso de primers heterólogos pudo no captar la diversidad genética real de la especie, en el estudio de Argudo (2017) se estandarizaron 14 marcadores microsatélites homólogos. En las mismas 3 regiones analizadas por Cobo et al

(2016), se reportó una diversidad genética moderadamente alta ($He=0.63$), y no se encontró una estructura poblacional definida, pero se observó que los individuos de Quilotoa y Sigchos se agruparon de forma independiente (Argudo, 2017). Sin embargo, dado que ambos estudios cubrieron únicamente una parte de la región norte del Ecuador, se sugirió extender el rango de muestreo.

Por tal razón, en este proyecto de investigación se buscó caracterizar la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño en las diez provincias de la sierra ecuatoriana, mediante el uso de los marcadores microsatélites homólogos para *V. floribundum*, diseñados y estandarizados por Argudo (2017) en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional del mortiño, a lo largo de las 10 provincias de la sierra ecuatoriana, mediante el uso de 16 marcadores moleculares microsatélites (SSR) homólogos para la especie.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la diversidad genética y el polimorfismo alélico del mortiño en las 10 provincias de la sierra ecuatoriana, utilizando marcadores microsatélites (SSR) homólogos para *V. floribundum*.
- Determinar la estructura poblacional del mortiño a lo largo de la sierra ecuatoriana a través de diferentes métodos estadísticos, con el fin de establecer diferentes agrupamientos y patrones de distribución.
- Analizar si la diversidad genética del mortiño en la sierra ecuatoriana se ve afectada por la fragmentación de los páramos en la región Andina.

3. Justificación

En el Ecuador, el mortiño es una especie de alto valor comercial debido a su fruto comestible. Este posee un alto contenido de antocianinas y compuestos polifenólicos, siendo de alto interés para usos medicinales (Abreu et al, 2014). Los frutos se recolectan principalmente en noviembre para la producción de la colada morada en el Día de los Difuntos. Son recolectados de manera silvestre, directamente de los páramos, y se comercializan en los mercados locales. Hasta la actualidad, no existen cultivos establecidos de la especie, dado que su domesticación y propagación ha resultado ser problemática (Magnitskiy et al, 2011). Una de estas razones, es el escaso número de semillas fértiles producidas por fruto (Chaparro y Becerra, 1999).

La especie puede considerarse como vulnerable, debido a la fragmentación de los páramos de la región andina. La fragmentación es un resultado de actividades antropogénicas, como la quema y el pastoreo, para el establecimiento de cultivos de otras especies (Astudillo et al, 2019; Echeverry y Harper, 2009). La fragmentación de este hábitat podría reducir la diversidad genética, y afectar la estructura poblacional del mortiño. Se ha reportado que los parches generan un aislamiento y la reducción del tamaño de las poblaciones, que podrían asociarse con posibles cuellos de botella y la reducción de flujo génico (Young, 1996). Como se mencionó anteriormente, una menor diversidad genética se asocia a una menor probabilidad de adaptarse a perturbaciones del medio ambiente, por lo que la especie quedaría vulnerable ante cambios en el ecosistema (Bellard et al, 2012).

Por tal razón, el estudio de la diversidad genética y estructura poblacional de *V. floribundum* es útil para analizar su estado a lo largo de la sierra ecuatoriana, determinar patrones de evolución, comportamientos reproductivos, y modelos de dispersión. Los resultados obtenidos en este estudio podrían ser la base para el desarrollo de programas de

conservación para un manejo adecuado de este importante recurso biológico, y de los ecosistemas en los que se encuentra. Además, con el análisis de los individuos más representativos se podría desarrollar bancos de germoplasma de semillas o tejidos de la especie, útiles no solo para su conservación, sino para el establecimiento de programas de mejoramiento genético, y agricultura sustentable.

4. Área de estudio

El área en este estudio comprende a 10 provincias de la sierra ecuatoriana, desde la provincia de Carchi en el norte, hasta Loja en el sur. El material vegetal fue recolectado en 27 localidades distribuidas a lo largo de la sierra ecuatoriana, en un rango altitudinal de 2800 a 4200 msnm. La recolección se realizó tanto en parques nacionales y áreas protegidas, como en los páramos en general de Carchi en El Ángel, San Gabriel y La Cofradía; Imbabura en Cotacachi, Santa Lucía y Cahuasquí; Pichincha en Lloa, Cayambe y Mojanda; Cotopaxi en el Parque Nacional Cotopaxi, Quilotoa y Sigchos; Tungurahua en Carihuairazo y Tisandeo; Bolívar en Cebapamba, Salinas, y Salinas Norte; Chimborazo en Quimiac; Cañar en San Miguel, Cerro Abuga y Surimpalti; Azuay en el Parque Nacional Cajas (Toreadora, Cajas y Cruces); y Loja en Saraguro, el Parque Nacional Podocarpus y Santiago (Figura 1). El muestreo en las diferentes localidades se realizó tras la obtención de los respectivos permisos de colección otorgados por el Ministerio del Ambiente (Anexo A).

5. Materiales

5.1. Colección de muestras de mortiño

- Tijeras
- Fundas Ziploc

- Marcador permanente
- GPS (Garmin eTrex 10 Worldwide Handheld GPS Navigator)
- Cooler
- Ice packs

5.2. Extracción de ADN a partir de hojas de mortiño

- Hojas de los individuos de *V. floribundum* muestreados
- Morteros y pistilos
- Nitrógeno líquido (N₂)
- Buffer de extracción CTAB 2X
- 2, β-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Isopropanol 100% a 4°C (Merck)
- Etanol 75%
- Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Tubos Eppendorf 1.5 ml
- Sorbona (BIOBASE)
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

5.3. Cuantificación y dilución del ADN

- ADN extraído de individuos de *V. floribundum*
- NanoDrop 2000 (ThermoScientific)
- Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Ultra-Pure™ Distilled Water (GIBCO)

5.4. Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR

- ADN diluido de 100 individuos de *V. floribundum* (20 ng/ul)

- 16 pares de primers SSR homólogos (Anexo B; Argudo, 2017)
 - 16 primers forward modificados con el oligonucleótido o cola universal 5'-GCCTCCCTCGCGCCA-3' (Blacket et al, 2012)
- Oligonucleótidos 3'-CGGAGGGAGCGCGGT-5' (complementarios a la cola universal) marcados con fluoróforos VIC, 6FAM, NED o PET.
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Tubos Eppendorf 0.2 mL
- Taq Platinum ADN polimerasa 5 U/ul (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- Ultra-pure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTPs 10mM (Invitrogen)
- Termociclador T100 (BIORAD)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

5.5. Electroforesis en geles de agarosa

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

5.6. Genotipado de regiones microsatélites SSR amplificadas

- Placas MicroAmp® Optima 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems)
- MicroAmp® 8-Cap Strip (Applied Biosystems)

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

5.7. Análisis de datos

- Microsoft Excel®
 - GenAlex 6.501 (Peakall y Smouse, 2012)
- Software RStudio (RStudio, 2015)
- Software STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al, 2000)
- Software CLUMPP (Jakobsson y Rosenberg, 2007)
- Software DISTRUCT (Rosenberg, 2004)

6. Métodos

6.1. Obtención de material vegetal

La recolección de las muestras de material vegetal de hojas de individuos de mortiño se realizó en Carchi (El Ángel, San Gabriel y La Cofradía), Imbabura (Cotacachi, Santa Lucía y Cahuasquí), Pichincha (Lloa, Volcán Cayambe y Mojanda), Cotopaxi (Parque Nacional Cotopaxi, Quilotoa y Sigchos), Tungurahua (Carihuairazo y Tisandeo), Bolívar (Cebapamba, Salinas, y Salinas Norte), Chimborazo (Quimiac), Cañar (San Miguel, Cerro Abuga y Surimpalti), Azuay (Toreadora, Cajas y Cruces) y Loja (San Pablo, Parque Nacional Podocarpus y Santiago); en un total de 10 salidas de campo entre el periodo de mayo del 2017 a agosto del 2018 (Figura 1).

Se recolectaron de 5 a 7 hojas de 10 individuos por localidad separados entre al menos 100 m de distancia; a excepción de Chimborazo y Tungurahua en donde se recolectó material de una sola localidad y de dos localidades respectivamente, debido a la ausencia de individuos en otras localidades de ambas provincias. Se obtuvo un total de 252 muestras de material

vegetal entre las 27 localidades. Para cada individuo se tomaron las coordenadas satelitales y la respectiva altitud, mediante el uso de un GPS (Anexo C).

Las muestras recolectadas se colocaron en fundas Ziploc, y se rotularon según un código basado en la letra inicial de la provincia y el número de muestra recolectada (por ejemplo: A001 corresponde a la primera muestra recolectada en la provincia de Azuay). Las muestras recolectadas se colocaron en una hielera para transportarlas manteniendo una cadena de frío hasta el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito en donde las hojas se almacenaron en una congeladora a -20°C .

Finalmente, del total de muestras recolectadas se seleccionaron un total de 10 individuos por provincia, de 3 a 4 individuos por localidad, en base a su distribución en el área geográfica, concentración y calidad de ADN. El análisis de diversidad genética se realizó con 100 individuos en total.

6.2. Extracción y cuantificación de ADN de mortiño

La extracción se realizó a partir de hojas recolectadas de mortiño mediante el método de CTAB, previamente estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal (Cobo, 2014). En primer lugar, se colocaron aproximadamente 80 mg de tejido foliar en un mortero, que fue triturado con nitrógeno líquido y posteriormente se le agregó 800 μl de buffer CTAB 2X. Posteriormente, se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml previamente etiquetado con el mismo código de recolección de campo, se añadió 8 μl de 2, β -mercaptoetanol en una sorbona, homogeneizando las muestras, y se incubó a 62°C en una cama de arena durante 1 hora, agitando por inversión los tubos cada 15 minutos. Tras la incubación, se añadieron 500 μl de una solución de cloroformo - alcohol isoamílico 24:1, se dejó en reposo los tubos por 20 minutos y se centrifugó por otros 20 minutos a 13200 rpm. Después, se recuperó 500 μl de sobrenadante, se agregaron 500 μl de isopropanol frío y se mezcló por inversión para que el ADN se precipite. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se observó la formación del pellet

y se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con etanol al 75% agitando el tubo hasta que el pellet se desprege. Finalmente se descartó el etanol, se dejó secar el pellet en una cámara de flujo laminar por 1 hora, se resuspendió en 50 μ l de TE 1X, y se conservó a - 20°C en el congelador del Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Por otro lado, la cuantificación del ADN extraído se realizó en un NanoDrop 2000 del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, utilizando como blanco el TE 1X en el que se resuspendió el ADN. La calidad se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, en donde se observó la presencia de la banda de ADN genómico (Figura 2).

6.3. Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites

Los marcadores microsatélites específicos para *Vaccinium floribundum* Kunth. fueron estandarizados previamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal por Argudo (2017). Se seleccionaron dieciséis marcadores microsatélites que presentaron valores de contenido de información polimórfica (PIC) entre 0,26 y 0,9 (Tabla 1).

El ADN genómico (20 ng) se amplificó por PCR en una reacción de 30 μ l que contenía buffer de PCR (1X), cloruro de magnesio (2mM), primers *forward* (0.15 μ M) y *reverse* (0.5 μ M), cola universal A marcada con un fluoróforo (0.5 μ M), dNTPs (0.2mM), y Taq polimerasa (1U). Los primers *forward* estaban modificados con una secuencia adicional, complementaria a la secuencia de la cola universal A marcada con un fluoróforo (VIC, 6FAM, NED o PET), necesaria para el genotipado de los loci amplificados. Durante la PCR este primer *forward* modificado se agota por la baja concentración inicial (0.15 μ M) y posteriormente por complementariedad se incorpora la cola universal A marcada. El producto final son amplicones marcados con un fluoróforo en el extremo 5' para su posterior genotipado (Blacket et al, 2012).

La amplificación se realizó en 40 ciclos, con un tiempo de desnaturalización inicial de 15 minutos, desnaturalización de 30 segundos a 94°C, de annealing de 90 segundos a temperaturas entre 58°C a 63°C dependiendo del locus amplificado (Anexo B), extensión de

60 segundos a 72°C, y extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos resultantes de la amplificación (amplicones marcados con un fluoróforo) se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%. Finalmente, los amplicones se conservaron en refrigeración a -4°C.

6.4. Genotipado

Los amplicones marcados con el fluoróforo se transfirieron hacia los pocillos de las placas MicroAmp Optical. En cada pocillo se colocaron 10 ul de producto de PCR de cuatro reacciones distintas, es decir, distintos loci microsatélites marcados cada uno con un fluoróforo diferente de un mismo individuo. Las placas con los amplicones se enviaron a la empresa MACROGEN en Seúl (Corea), en donde se genotiparon con el fin de obtener los tamaños de los alelos y definir si el individuo analizado es homocigoto o heterocigoto. El genotipo de cada individuo para cada locus microsatélite fue obtenido a través de electroforesis capilar, empleando el secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Los resultados obtenidos en archivos .fsa se interpretaron en el software GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012) mediante la observación de picos de fluorescencia para los locus amplificados, tomando al pico observado como un alelo y determinando de esa manera el tamaño del mismo. Posteriormente con los alelos obtenidos se elaboró una matriz alélica con una extensión .csv donde los individuos se encontraban en las filas y los locus en las columnas (Anexo D).

6.5. Análisis de diversidad genética del mortino

6.5.1. Análisis de la diversidad genética

Los análisis se realizaron utilizando los paquetes *adegenet* y *polysat* del software RStudio para la obtención de índices de diversidad como valores de heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho), y número de alelos por locus y por localidad. El número de alelos privados por localidad se obtuvo utilizando el paquete *poppr*. Por otro lado, se empleó

paquete *hierfstat* para calcular los valores globales de F_{st} para analizar la diversidad genética interpoblacional. De la misma manera, se utilizó el complemento de Excel, GenAlex 6.501, para la realización del análisis de varianza molecular (AMOVA).

6.5.2. Distribución de la diversidad genética

Se obtuvo una matriz de distancias genéticas entre individuos y entre localidades. La primera, a través del paquete *stats* de RStudio, empleando el método “euclidean” para el cálculo de distancias euclidianas. Las distancias genéticas entre localidades se calcularon a través del paquete *adegenet*, con el método 1 correspondiente al cálculo de las distancias de Nei. El análisis de coordenadas principales (PCoA) por individuos y por localidades se realizó mediante el paquete *ade4* con el comando “*dudi.pco*”, obteniendo la gráfica a través del comando “*autoplot*” del paquete *ggplot*. El dendograma Neighbor Joining (NJ), se elaboró con el comando “*bionj*” del paquete *ape*. Por otro lado, se elaboró una red de migración mediante el paquete *diveRsity* y el comando “*divMigrate*”. Se utilizó GenAlex 6.501, para la realización de una prueba de Mantel, para evaluar si las distancias genéticas obtenidas están relacionadas con las distancias geográficas entre individuos.

6.6. Análisis de la estructura poblacional del mortíño

Se realizó un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) para evaluar la existencia de una estructura poblacional definida en las poblaciones analizadas. El DAPC genera clusters de acuerdo a los genotipos que presentan los individuos para los loci analizados. Para esto se utilizó el paquete *adegenet* de RStudio, conjunto con los comandos “*find.clusters*”, “*dapc*” y “*scatter*”.

Se utilizó el software STRUCTURE para analizar la estructura poblacional mediante la determinación del posible número de agrupaciones genéticas mediante inferencia bayesiana (Pritchard et al, 2000). Se realizaron tres análisis diferentes, el primero, en base a lo reportado por Cobo (2014), probando valores de $K=1$ a $K=10$ con 15 repeticiones independientes para

cada uno, con un modelo de *admixture*, con 100000 pasos de *burn-in* y 100000 de pasos de corrida de cálculos de Markov Chain y Montecarlo, sin incluir previamente una población putativa. El segundo análisis se realizó probando el mismo rango de valores de K, con 10 repeticiones independientes para cada uno, con un modelo de *admixture*, con 100000 pasos de *burn-in* y 1000000 de pasos de corrida de cálculos de MCM. Finalmente, el tercer análisis se realizó bajo los mismos parámetros del segundo, estableciendo esta vez la localidad de la cual provenía cada muestra. Los resultados obtenidos se analizaron en el programa STRUCTURE Harvester para la obtención de un valor óptimo de *K* en base al doble algoritmo natural de la probabilidad de cada K (Evanno et al, 2005). Los archivos CLUMPP .indfile y .popfile que se generaron se ingresaron en el programa CLUMPP para alinear y resumir las iteraciones de los valores K de las corridas utilizando el algoritmo de *greedy* (Jakobsson y Rosenberg, 2007). Finalmente, los gráficos finales fueron obtenidos empleando el software *distruct* (Gilbert et al, 2012; Rosenberg, 2004).

7. Resultados

7.1. Colección de muestras de mortiño, extracción y cuantificación de ADN

Se recolectaron hojas de un total de 247 individuos de mortiño en 27 localidades (Anexo C). En Chimborazo y Tungurahua el muestreo no se realizó en las 3 localidades definidas, debido a que se encontraron individuos de mortiño únicamente en una y dos localidades respectivamente. En Carchi, Pichincha, Bolívar, Tungurahua, Chimborazo y Cañar se encontró un máximo de 7 a 9 individuos en algunas localidades, por lo que no se pudieron completar los 10 que se habían establecido.

Por otro lado, se logró extraer exitosamente el ADN genómico de 127 individuos de mortiño. El ADN genómico extraído presentó un rango de concentración de 115 a 1230 ng/ul, con un promedio de 480 ng/ul (Anexo E). El ADN extraído resultó ser de buena calidad dado

su alto peso molecular (Figura 2), y los valores obtenidos para las relaciones de absorbancia 260/230 y 260/280 que se presentaron dentro del rango esperado alrededor de 2.0 y 1.8 respectivamente.

7.2. Amplificación y genotipado de regiones microsatélites con primers homólogos

Se amplificó exitosamente las 100 muestras de mortiño seleccionadas, con los 16 pares de primers homólogos, y se genotiparon con una eficiencia del 98.06% (Anexo D). Los 16 loci microsatélites demostraron ser polimórficos, como ya se había reportado por Argudo (2017), generando un número total de 179 alelos, con un rango de 6 a 20 alelos, y un promedio de 11.2 alelos por locus. Los loci Mo025 y Mo020 resultaron ser los más informativos al presentar el mayor número de alelos ($N_a=20$) y un valor PIC de 0.88 y 0.90 respectivamente. En contraste, el menor número de alelos se encontró en los loci Mo011 y Mo002 ($N_a=6$), que presentaron valores PIC de 0.26 y 0.49 respectivamente (Tabla 1).

7.3. Análisis de datos

7.3.1. Diversidad genética del mortiño en la sierra ecuatoriana

El número de alelos por localidad varió entre 25 a 65 alelos. Las localidades que presentaron el mayor número de alelos fueron Quimiac en Chimborazo ($N_a=65$) y Carihuairazo en Tungurahua ($N_a=60$), de los cuales fueron exclusivos para cada localidad, 5 y 6 alelos respectivamente. El menor número de alelos se encontró en los individuos de Lloa en Pichincha ($N_a=29$), Cayambe en Imbabura ($N_a=28$), Cruces ($N_a=28$) y Cajas ($N_a=26$) en Azuay, y Quiltoa en Cotopaxi ($N_a=26$), con un número de alelos privados entre 1 y 3. En las demás localidades se encontró entre 34 y 53 alelos, con un número de alelos privados entre 1 y 5; con excepción de Surimpalti, El Ángel, La Cofradía y Sigchos, que no presentaron alelos privados (Tabla 2). Los alelos privados representaron el 4.7% del total de alelos encontrados.

Los valores de heterocigosidad observada (H_o) por locus se encontraron entre un rango de 0.22 y 0.61 con un promedio de 0.41. Por otro lado, la heterocigosidad esperada global (H_e)

fue de 0.73, con un rango entre 0.26 y 0.91, revelando una diversidad genética moderadamente alta para el mortiño en la sierra ecuatoriana (Tabla 1). El análisis de varianza molecular (AMOVA) demostró que el 70.35% de esta variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones y el 29.65% entre las poblaciones (Figura 3).

Al comparar los valores de heterocigosidad observada y esperada entre localidades, los valores de heterocigosidad observada variaron entre 0.06 y 0.61, y los de la heterocigosidad esperada entre 0.21 y 0.61 (Tabla 2). Los valores de heterocigosidad esperada más altos se encontraron en Carihuairazo en Tungurahua ($H_e=0.61$), Quimiac en Chimborazo ($H_e=0.6$) y Podocarpus en Loja ($H_e=0.54$). Por otro lado, la menor heterocigosidad esperada se encontró en Cayambe ($H_e=0.21$) y Lloa ($H_e=0.27$) en Pichincha, Quilotoa en Cotopaxi ($H_e=0.21$), y Cajas ($H_e=0.24$) y Cruces ($H_e=0.28$) en Azuay; denotando un menor grado de variación genética (Tabla 2). En 11 de las 27 localidades los valores de la heterocigosidad observada (H_o) fueron mayor a los de la heterocigosidad esperada (H_e).

7.3.2. Distribución de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional

El análisis de coordenadas principales (PCoA) denotó la presencia de cuatro posibles clústers genéticos. El primero en el cuadrante superior (color rojo), el segundo en el cuadrante derecho (color amarillo), el tercero en el cuadrante inferior (color azul) y el cuarto en el cuadrante superior izquierdo (color verde). El primer clúster se compone por los individuos de las localidades del norte de la región desde Carchi hasta Cotopaxi, el segundo por los del centro desde Cotopaxi hasta Chimborazo, y el tercero por los del sur por Cañar y Loja. El cuarto clúster agrupa exclusivamente a los individuos de Quilotoa en Cotopaxi, y de Azuay, y se encuentra separado de los demás grupos (Figura 4). Estos resultados fueron respaldados por el dendrograma NJ en donde se distinguen cuatro clústers similares, de los individuos del norte

(C1), centro (C2) y sur (C3) de la región respectivamente, y los de Quilotoa y Azuay (C4) (Figura 5).

El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) agrupó a los individuos en los cuatro clústers observados en el PCoA. Considerando estos cuatro clústers como cuatro regiones, se observó que las regiones 1 y 2, compuestas por los individuos del norte y del centro respectivamente, se encuentran cercanas entre sí, altamente solapadas. Por otro lado, las regiones 3 y 4, compuestas por individuos del sur y exclusivamente los de Quilotoa y Azuay, están alejadas de las regiones 1 y 2, siendo la región 4 la que más se separa con respecto a las demás regiones (Figura 6). Estos resultados coincidieron con los valores *pairwise Fst*, encontrando la mayor divergencia genética entre la región 4 y el resto de las regiones ($0.102 \leq Fst \leq 0.162$). La mayor diferenciación genética se encontró entre las regiones 3 y 4 con un *Fst* de 0.162. Por otro lado, el *Fst* de 0.056 entre las regiones 1 y 2 fue el más bajo en comparación a los *Fsts* entre las demás regiones, presentando entonces el menor grado de diferenciación genética (Tabla 3). Dentro de la región 4, los valores *pairwise Fst* entre localidades revelaron que Quilotoa en Cotopaxi presenta la mayor diferenciación genética con respecto a las localidades de Azuay ($0.260 \leq Fst \leq 0.366$). En Azuay, el grado de diferenciación genética fue bajo, sugiriendo un alto flujo génico entre las tres localidades de esta provincia en el estudio ($0.110 \leq Fst \leq 0.187$) (Tabla 4). Este resultado, se evidenció también en el AMOVA realizado para la región 4, en donde el 70% de la variabilidad se encontró dentro de las poblaciones, y el 30% entre poblaciones (Figura 7).

En el análisis de STRUCTURE se apreció una estructura poblacional altamente consistente con los patrones de agrupamiento encontrados en el PCoA, el dendrograma NJ y el DAPC. El K óptimo fue de 4 ($\Delta K=110.88$), separando a los individuos en cuatro clústers genéticos que representan las cuatro regiones ya mencionadas (Tabla 5). El clúster rojo está representado en su mayoría por los individuos del norte, el clúster amarillo por los del centro,

y el clúster azul por los del sur. En este caso también se observó la agrupación atípica de los individuos de Quilotoa y Azuay (región 4), dentro del clúster verde. En general, se observó una baja contribución de los diferentes acervos en algunas localidades, con excepción de Quilotoa y Azuay que presentan una única contribución del acervo verde con una mínima penetrancia del acervo rojo, de los individuos del norte (Figura 8).

Para analizar la direccionalidad del flujo génico entre las cuatro regiones se construyó una red de migración. Este método asume un grupo hipotético de migrantes en cada población y realiza una estimación por pares de la diferenciación genética entre los grupos hipotéticos de migrantes y las poblaciones. En la red de migración, la proximidad relativa de los “centros” refleja la similitud genética de las poblaciones, mientras que las líneas de conexión reflejan la magnitud relativa de la migración entre las poblaciones (Sundqvist et al, 2016). Se observa que las regiones 1 y 2 presentan una mayor similitud genética, y que la región 4 presenta una mayor diferenciación con respecto a las demás regiones. De la misma manera, los resultados denotan un alto flujo génico bidireccional entre las regiones 1 y 2, y entre ambas regiones y la región 3. Por otro lado, ninguna de las regiones presenta un flujo génico hacia la región 4, y esta región presenta un mínimo flujo hacia las demás regiones (Figura 9).

Se realizó una prueba de Mantel para evaluar una posible correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica, dado que tres de las regiones agrupan a individuos del norte, centro y sur de la región, respectivamente. Al evaluar toda la sierra ecuatoriana, el coeficiente de correlación (r_{xy}) de 0.26 ($p=0.001$) (Figura 10), cercano a 0, denotó que no existe correlación entre las distancias genética y geográficas (Diniz-Filho et al, 2016). Por lo tanto, se descartó que la diversidad genética del mortiño esté estructurada bajo un modelo de distancia por aislamiento geográfico.

8. Discusión

8.1. Colección de muestras de mortiño y extracción de ADN

La colección de hojas de mortiño se realizó en 27 de las 30 localidades propuestas, debido a que en Chimborazo y Tungurahua solo se encontraron individuos de esta especie en una y dos localidades respectivamente. Además, de las 27 localidades muestreadas, en 6 no se pudieron encontrar los 10 individuos planeados por localidad. Se ha reportado que las comunidades rurales usan directamente el páramo para cultivos de sustento y para el pastoreo de animales domésticos, convirtiendo grandes extensiones del páramo en haciendas privadas para la ganadería y agricultura (Hofstede et al, 2002). Esto se observó en las localidades en las que no se completó el muestreo, principalmente de Chimborazo y Tungurahua en donde no se encontró acceso por sobre los 2000 msnm por cultivos establecidos. La alteración del páramo por estas prácticas se ha asociado con la afección de especies silvestres y el hábitat en general. La ausencia de individuos de mortiño en las diferentes localidades podría explicarse entonces por la manipulación del terreno y la presencia de animales que arrancan las plantas de raíz (Ramón, 2002).

8.2. Amplificación y genotipado de regiones microsatélites con primers homólogos

Si bien se logró amplificar con éxito los 16 loci microsatélites en los 100 individuos, el genotipado presentó un *missing data* del 1.94% por ausencia de picos en el electroferograma. Esta discrepancia de resultados entre la amplificación y el genotipado podría deberse a diferentes factores, como la falta de incorporación de la cola universal (*Tail A*) durante la amplificación, por un bajo número de ciclos o una baja concentración del primer *forward* modificado (Blacket et al, 2012; Papa, 2009).

Los valores PIC de los 16 marcadores microsatélites utilizados variaron en un rango de 0.26 a 0.90, con un promedio de 0.69 (>0.5) que los caracteriza como marcadores altamente

informativos (Botstein et al, 1980). Argudo (2017) reportó valores PIC de 0.36 a 0.83 con un promedio de 0.59 para 14 de los 16 marcadores analizados en esta investigación. Si bien el valor promedio reportado fue distinto al obtenido, Argudo (2017) concuerda respecto a la alta capacidad de estos marcadores para detectar variaciones alélicas. Ambos estudios obtuvieron un PIC alto para el marcador Mo020, siendo este uno de los más informativos. La obtención de un valor PIC promedio (0.69) mayor al reportado anteriormente (0.59) puede explicarse por diferentes factores como el uso de un mayor número de marcadores y la extensión del área de estudio (Cheskonov y Artemyeva, 2015). Los loci Mo004 y Mo025 no reportados por Argudo (2017) pero incluidos en esta investigación presentaron valores altos de PIC de 0.77 y 0.90 respectivamente, aumentando entonces el valor promedio obtenido. Este aumento podría relacionarse también con la detección de nuevos alelos por el análisis de nuevas localidades como Carihuirazo ($N_{pa}=6$), dado que el valor PIC depende del número y la frecuencia de alelos en una población (Nagy et al, 2012).

Para marcadores homólogos a otras especies del mismo género como *V. macrocarpon* se han reportado promedios de PIC menores (0.59) a pesar del uso de un mayor número de marcadores (Schlautman et al, 2015). Los procesos de selección de especies domesticadas, como *V. macrocarpon*, se asocian con una reducción de la variabilidad genética y el número de alelos (Carvalho et al, 2018). En contraste, las especies silvestres como *V. floribundum* presentan una mayor variabilidad por procesos de reproducción al azar, detectando un mayor número de alelos que podría explicar la obtención de valores de PIC más altos (Gao et al, 2017).

8.3. Diversidad genética del mortño en la sierra ecuatoriana

Se encontró un número total de 179 alelos en 100 individuos de *V. floribundum*, que arroja un promedio de 11.2 alelos por locus. Estos resultados son comparables con los reportados con especies del mismo género como *V. corymbosum* y *V. angustifolium* dentro de

la sección *Cyanococcus* (14.2 alelos por locus) (Bian et al, 2014); y *V. macrocarpon* (9.8 alelos por locus) (Zalapa et al, 2015). La heterocigosidad esperada global ($He=0.73$) reveló que el mortiño en Ecuador presenta una diversidad genética moderadamente alta. Este resultado fue mayor al reportado para *V. macrocarpon* ($He=0.66$) y menor con respecto a *V. corymbosum* y *V. agustifolium* ($He=0.87$) (Bian et al, 2014; Zalapa et al, 2015). Esto se podría explicar por la alta domesticación de *V. macrocarpon*, que genera una pérdida de diversidad; y por el análisis de germoplasmas silvestres y domesticados de *V. corymbosum* y *V. agustifolium*. Por otro lado, heterocigosidades esperadas similares se obtuvieron en análisis de la diversidad genética con marcadores SSR de especies netamente silvestres como *V. sieboldii* ($He=0.73$) y *V. ciliatum* ($He=0.75$) en Japón, consideradas como vulnerables por la fragmentación de su hábitat (Hirai et al, 2010). Tanto para estas especies, como para el mortiño, una diversidad moderadamente alta podría explicarse por una reproducción aleatoria, común en especies silvestres (Gao et al, 2017).

Con respecto a los análisis de la diversidad genética del mortiño, en el estudio de Cobo et al (2016) con marcadores heterólogos, se reportó un número promedio de 6.1 alelos por locus, y una heterocigosidad esperada global de 0.49, en 9 localidades del norte de la sierra ecuatoriana. En la misma área de estudio, mediante la estandarización y uso de marcadores homólogos para *V. floribundum*, Argudo (2017) reportó un número promedio de 8.14 alelos por locus y una heterocigosidad esperada global de 0.63. Los valores más bajos de los índices reportados por Cobo et al (2016) con respecto a los encontrados por Argudo (2017) y en este estudio ($N_a=11.2$; $He=0.73$), podrían explicarse por el uso de primers heterólogos, desarrollados para la amplificación de regiones microsatélites en *V. corymbosum*. Se ha reportado que la transferencia de marcadores moleculares a especies diferentes podría generar la presencia de alelos nulos que tienden a sesgar la estimación de la heterocigosidad (Guidugli et al, 2010; Nazareno et al, 2009; Wang et al, 2012). La obtención de alelos nulos se asocia a

variaciones en las regiones flanqueantes que evitan la hibridación del primer con el ADN complementario, o a deslizamientos de la polimerasa durante la amplificación (Chapuis y Estoup, 2006).

Los índices de diversidad reportados para el mortiño por Argudo (2017) fueron menores a los que se encontraron en este estudio. Dado el uso de los mismos marcadores SSR homólogos para la estimación de los niveles de variabilidad, la discrepancia de los resultados podría estar asociada con la extensión del área geográfica en donde se recolectaron las muestras. En contraste a las 27 localidades incluidas en este estudio, distribuidas del norte al sur de la sierra ecuatoriana, Argudo (2017) caracterizó la diversidad genética del mortiño únicamente en 9 localidades del norte de la región. El rango geográfico y la distribución de las poblaciones han demostrado tener un impacto significativo en la cantidad de variación genética de una especie (Levy et al, 2016). En diferentes estudios se ha reportado una mayor variabilidad genética para las especies distribuidas en un amplio rango geográfico respecto a las que se encuentran delimitadas en una zona específica (Gitzendanner y Soltis, 2000; Hamrick et al, 1992; Karron, 1987). La extensión del área de estudio a las 27 localidades distribuidas en las 10 provincias de la sierra ecuatoriana podría explicar entonces el aumento del grado de diversidad genética encontrado ($He=0.73$) respecto al reportado por Argudo (2017) ($He=0.63$).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que el 70% de la variabilidad se encuentra dentro de las poblaciones y el 30% entre las poblaciones. Si bien estos resultados difirieron respecto a los reportados por Cobo et al (2016) y Argudo (2017), en ambos casos se obtuvo que la mayor variabilidad se encontró dentro de las poblaciones. Este resultado coincide con los reportados para otras especies del género, como *V. corymbosum*, *V. angustifolium*, *V. uliginosum*, y *V. vitis-idaea* (Tailor et al, 2017; Zoratti et al, 2015). Se ha reportado que las especies de plantas leñosas, como las del género *Vaccinium*, presentan diferentes sistemas de reproducción sexual mediante polinización cruzada y autopolinización, que están asociados

con la presencia de una mayor variación dentro de las poblaciones (Albert et al, 2005; Hamrick et al, 1992). Además, se caracterizan por una alta tasa de dispersión de semillas mediante el viento y por polinizadores, que explica una disminución de la variación entre poblaciones por altos niveles de flujo génico (Sheng et al, 2005).

En general, la heterocigosidad esperada ($H_e=0.73$) fue mayor a la heterocigosidad observada ($H_o=0.42$). Se ha reportado que la diferencia entre ambos índices, se puede deber a diferentes factores ecológicos y evolutivos como la endogamia y la estratificación de la población (Wigginton et al, 2005). En el mortiño, estos podrían explicarse por las altas tasas de autopolinización, como ha sido reportado para otras especies silvestres como *V. darrowii* y *V. myrtilus* (Chavez y Lyrene, 2009; Guillaume y Jacquemart, 1999; Luteyn, 2002). También, podrían estar directamente asociados a la formación de “islas” por la fragmentación de los páramos, que generan un aislamiento geográfico y reducen el tamaño de las poblaciones (Arellano y Rangel, 2010; Young et al, 1996). Esto genera una mayor reproducción entre individuos emparentados, favoreciendo la homocigosis y disminuyendo la heterocigosidad observada (Leimu et al, 2010; Sampson et al, 2016).

8.4. Distribución de la diversidad genética y estimación de la estructura poblacional

En base a métodos de ordenamiento (PCoA y DAPC) y enfoques bayesianos (STRUCTURE) se determinó que el mortiño en Ecuador puede estructurarse en cuatro regiones, que según la prueba de Mantel ($r_{xy}=0.26$) no están explicadas por un patrón geográfico. La primera compuesta por los individuos del norte, la segunda por los del centro, la tercera por los del sur; y una que agrupa exclusivamente a los individuos de Quilotoa y Azuay, formando un clúster genético distinto. Los análisis de diferenciación genética en base a los valores F_{st} , y la red de migración generada, denotaron que las regiones 1 y 2 son genéticamente similares y presentan un alto flujo de genes bidireccional; y que la región 4 presenta la mayor diferenciación con respecto a las otras regiones y un flujo génico

unidireccional mínimo. Hasta el momento, no se ha reportado la historia evolutiva de *Vaccinium floribundum*, por lo que para explicar los agrupamientos encontrados se utilizó información sobre la evolución y geografía de los páramos de la región andina y las oscilaciones climáticas en el Pleistoceno, que impactaron directamente en la evolución y distribución de la flora y la fauna (Luteyn, 1999; Qu et al, 2011).

La región centro-norte del Ecuador, enmarcada por la cordillera oriental y occidental, está caracterizada por presentar múltiples volcanes activos e inactivos (Anexo F) (Hall et al, 2008). Esta región ha recibido contribuciones recientes de proyecciones volcánicas (desde hace más de 10 000 años siendo la última reportada en el 2011) que han generado una capa piroclástica sobre los suelos, asociada a la acumulación de ceniza. En contraste, la región sur, desde Alausí en Chimborazo, se asienta sobre una base de suelo ferrítico antiguo, o roca metamórfica, que se caracteriza por la acumulación de arcilla (Moreno et al, 2018). El origen geológico de los suelos de la sierra ecuatoriana entonces podría explicar la diferenciación encontrada entre los individuos de las regiones 1 y 2 (norte y centro) con respecto a los de la región 3 (sur) ($F_{st}=0.077$), por las diferentes características presentadas entre la roca volcánica cubierta por una capa piroclástica, y la roca metamórfica. Por ejemplo, los suelos en la región 3, al ser más antiguos, presentan un pH más bajo (alta acidez) dado a que conservan las características de un clima más húmedo que el actual (Moreno et al, 2018). Por lo tanto, tras la actividad volcánica, los individuos en las regiones 1 y 2 podrían haberse adaptado a los diferentes cambios, como el del pH, generando la variación genotípica encontrada (Kochian et al, 2015; Laenoi et al, 2015).

Como se mencionó anteriormente, si bien las regiones 1 y 2 presentan un alto flujo génico, también presentan un cierto grado de diferenciación. Se ha reportado que, en último máximo glacial en el Pleistoceno, una masa de hielo se extendió a lo largo de los Andes, y que estos eventos glaciales influyeron directamente sobre la diversidad y estructura de las especies

(Zemlak et al, 2008). Durante la contracción de los páramos en el periodo glacial, las poblaciones de diferentes especies, que podrían haber incluido al mortiño, fueron separadas por la formación de las masas de hielo, reduciendo o evitando su flujo génico (Luby, 1999). Posteriormente, en los periodos de retroceso glacial, con el derretimiento del hielo y la expansión de los páramos, las poblaciones que se habían separado pudieron haber entrado en contacto nuevamente, presenciando un flujo génico, en un fenómeno que se conoce como contacto secundario (Murray y Hare, 2006; Zemlak et al, 2008). Estos procesos podrían explicar la baja diferenciación encontrada entre las regiones 1 y 2 ($F_{st}=0.056$), y el alto flujo génico dado a la ausencia de una barrera geográfica entre estas tras el derretimiento de las masas de hielo.

Por último, para explicar el agrupamiento atípico de la región 4, se revisaron los datos altitudinales, colectados en las salidas de campo (Anexo C). Los individuos de las localidades de Quilotoa y Azuay se recolectaron en el rango altitudinal más alto de este estudio, entre los 3900 y 4200 msnm (Anexo C), en parte de la zona superior del páramo conocida como superpáramo (Ramsay, 2001; Salgado et al, 1988; Sklenář y Balslev, 2005). A este rango altitudinal, la cobertura vegetal se rompe, formando parches de suelo abierto. Además, las condiciones son más fuertes, presentando temperaturas más bajas, recursos de nutrientes limitados, vientos más fuertes y periodos de cobertura de hielo (Luteyn y Balslev, 1992; Sklenář y Balslev, 2005). La adaptación de especies vegetales a condiciones ambientales más fuertes a mayores altitudes genera una presión selectiva sobre varios alelos, que ocasiona en cierto grado un cambio de genotipo reflejado también en el fenotipo (Peng et al, 2015). Estas condiciones se asocian con una reducción del tamaño de las plantas (Wesche et al, 2006); que en efecto fue observada en los individuos de mortiño que se presentaron como plantas rastreras, muestreados en Quilotoa y Azuay (Figura 11). También, se ha reportado que se favorece la propagación clonal debido a que les permite sobrevivir a largos periodos de oscilación

climática y producir copias de un genotipo adaptado, asociado con la presencia de genes de resistencia a heladas, y con la alteración de diferentes procesos fisiológicos y de desarrollo (Linhart y Gehring, 2003; Onoda y Anten, 2011; Peng et al, 2015).

En tal caso, el alto grado de diferenciación de la región 4 ($F_{st}=0.139$) podría deberse a los efectos altitudinales que causan la selección de estos genotipos adaptados, que, al presentar una alta tasa de propagación clonal, fijan alelos específicos. Esto también puede estar asociado a una disminución de la diversidad genética en dichas localidades, que podría explicar los bajos valores de heterocigosidad esperada en Quilotoa, y las localidades de Azuay ($H_e=0.27\pm 0.06$); y la presencia de los mismos alelos en loci reportados como polimórficos, en los distintos genotipos (Anexo G). Por otro lado, se ha reportado que los superpáramos forman “islas” separadas por los valles andinos, generando un aislamiento por altitud, que afecta el alcance de los polinizadores y disminuyen el flujo génico (Sklenář y Balslev, 2005). Además, el aislamiento de las poblaciones por altitud está asociado con un posible aislamiento reproductivo, debido a las diferencias en el tiempo de floración (Shi et al, 2011). Esto podría explicar el alto grado de diferenciación encontrada ($0.102 \leq F_{st} \leq 0.162$) y los resultados obtenidos en la red de migración en donde el flujo génico es mínimo, y unidireccional desde la región 4 hacia las demás regiones.

Es importante entender que si bien se asume que los microsatélites son marcadores neutros por encontrarse generalmente en regiones no codificantes, se ha reportado la presencia de loci microsatélites no neutros (Casa et al, 2005; Ellegren, 2004; Lazrek et al, 2009; Lin et al, 2017; Nielsen et al, 2006). Esto debido a que pueden encontrarse también en regiones codificantes y además estar ligados con genes específicos bajo procesos de selección, como los que se pueden dar en mayores altitudes (Shi et al, 2011). También, hay que tomar en cuenta que el mortiño no es la única especie del género *Vaccinium* en Ecuador; existen *V. meridionale*, *V. distichum* y *V. crenatum*, por lo que no es posible descartar que la agrupación atípica pueda

relacionarse con otra especie (Coba et al, 2012). Por lo tanto para probar la hipótesis de la formación del agrupamiento atípico de la región 4 se deben realizar estudios más profundos sobre el fenotipo y la ecología de los individuos de esta región, y analizar la neutralidad de los loci microsatélites empleados en este estudio.

Los resultados obtenidos revelaron que el mortiño en la sierra ecuatoriana presenta una diversidad genética moderadamente alta, con la mayor variación encontrada dentro de las localidades analizadas. Los clústers genéticos encontrados denotaron una alta influencia de la geografía y la historia evolutiva de la región andina sobre los patrones de estructura poblacional de la especie. El clúster compuesto por los individuos de Quilotoa y Azuay sugirió la selección y reproducción de genotipos adaptados, por efectos altitudinales. Finalmente, los altos valores en la diversidad genética son alentadores para el desarrollo de programas de conservación del mortiño en el Ecuador.

9. Conclusiones

- Se encontró que existe una diversidad genética moderadamente alta ($H_e=0.73$) del mortiño en la sierra ecuatoriana. El análisis de variación molecular indicó que el 70% de esta variabilidad genética se encuentra dentro de las poblaciones y el 30% entre las poblaciones.
- Los análisis de estructura poblacional revelaron la presencia de cuatro clústers genéticos (regiones): tres compuestos por los individuos del norte, centro y sur de la región, respectivamente; y uno que agrupa exclusivamente a los individuos de Quilotoa y Azuay, formando un grupo genético distinto.
- La mayor diferenciación genética se encontró entre la región 4 (Quilotoa y Azuay) y el resto de las regiones. Se evidenció un alto flujo génico bidireccional entre las regiones 1 y 2. No se presentó un flujo génico de las tres regiones hacia la región 4, y esta presentó un mínimo flujo génico hacia las demás regiones.
- Algunos hechos históricos de la región andina como las fluctuaciones climáticas que se dieron durante el Pleistoceno, o la diferencia entre suelos metamórficos y volcánicos de los Andes, podrían sustentar la formación de las regiones norte, centro y sur.
- La agrupación específica del Quilotoa y Azuay podría explicarse por una adaptación de los individuos de estas localidades a la altura.
- Estos resultados pueden ser la base para el desarrollo de programas de conservación de la especie, y del ecosistema en el que se desarrolla; y programas de agricultura sustentable.

10.Recomendaciones

- Ampliar las localidades de muestreo para tener un mayor porcentaje de cobertura de la sierra ecuatoriana, haciendo un énfasis en el área localizada entre el norte de Chimborazo y el sur de Azuay.
- Incorporar al análisis genético, individuos de *V. floribundum* de Venezuela, Colombia, Perú y Bolivia, con el fin de analizar el estado de la especie a lo largo de toda la región Andina.
- Amplificar regiones de herencia materna, como mitocondriales o de cloroplastos, para estudiar el proceso evolutivo de la especie, relaciones filogenéticas con especies cercanas, eventos de hibridación y biogeografía.
- Profundizar en el análisis de los individuos de las localidades de Quilotoa (Cotopaxi) y de Azuay, para evaluar si se está dando una presión selectiva sobre diferentes alelos por un efecto altitudinal.

11.Referencias

- Abreu, O. A., Barreto, G., y Prieto, S. (2014). Vaccinium (Ericaceae): Ethnobotany and pharmacological potentials. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 26(7), 577.
- Alarcón, K., Armijos, D., García, M., Iturralde, G., Jaramilo, T., Granda, y Alvarez, J. (2018). Wild Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) and Andean blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth) from the Highlands of Ecuador: Nutritional composition and protective effect on human dermal fibroblasts against cytotoxic oxidative damage. *Journal of Berry Research*, 8(3), 1-14.
- Albert, T., Raspé, O. y Jacquemart, A. (2005). Diversity and spatial structure of clones in *Vaccinium uliginosum* populations. *Canadian Journal of Botany*, 83(2), 211-218.
- Altukhov, Y. P. (1995). Intraspecific genetic diversity: Monitoring and conservation. *Genetika (Russian Federation)*.
- Arellano, P. y Rangel, C. (2010). Fragmentación y estado de conservación en páramos de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, 479 – 542.
- Argudo Rojas, A. D. (2017). *Desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites específicos para mortiño (Vaccinium floribundum Kunth)* (Bachelor's thesis, Quito).
- Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Al Sadoon, M., y Shobrak, M. (2011). DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi journal of biological sciences*, 18(3), 219-225.
- Armenteras, D., Gast, F., y Villareal, H. (2003). Andean forest fragmentation and the representativeness of protected natural areas in the eastern Andes, Colombia. *Biological conservation*, 113(2), 245-256.

- Astudillo, P. X., Schabo, D. G., Siddons, D. C., y Farwig, N. (2019). Patch-matrix movements of birds in the páramo landscape of the southern Andes of Ecuador. *Emu-Austral Ornithology*, 119(1), 53-60.
- Ballington, J. R., Luteyn, J. L., Thompson, M. M., Romoleroux, K., y Castillo, T. (1993). Rubus and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador.
- Barcaccia, G. (2010). Molecular markers for characterizing and conserving crop plant germplasm. In *Molecular techniques in crop improvement* (pp. 231-254). Springer, Dordrecht.
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., y Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology letters*, 15(4), 365-377.
- Bhargava, A. y Carmona, F. (2012). Marker assisted selection. *Biotechnology: New Ideas, New Developments*.
- Bian, Y., Ballington, J., Raja, A., Brouwer, C., Reid, R., Burke, M. y Brown, A. (2014). Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. *Molecular breeding*, 34(2), 675-689.
- Blacket, M. J., Robin, C., Good, R. T., Lee, S. F., y Miller, A. D. (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.
- Botstein, D., White, R., Skolnick, M. y Davis, R. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.
- Brazelton, D., y Strik, B. C. (2007). Perspective on the US and global blueberry industry. *Journal-American Pomological Society*, 61(3), 144.

- Brazelton, C. y Young, K. (2017). *World blueberry statistics and global market analysis*. California: International Blueberry Organization. Recuperado el 08 de marzo del 2019 de <http://www.internationalblueberry.org/>
- Camp, W. H. (1942). On the structure of populations in the genus *Vaccinium*. *Brittonia*, 4(2), 189-204.
- Carvalho, M., Matos, M. y Carnide, V. (2018). Identification of cultivated and wild *Vaccinium* species grown in Portugal. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 16(3), 07-01.
- Casa, A. M., Mitchell, S. E., Hamblin, M. T., Sun, H., Bowers, J. E., Paterson, A. H., y Kresovich, S. (2005). Diversity and selection in sorghum: simultaneous analyses using simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(1), 23-30.
- Chaparro de Valencia, M. L., y Becerra de Lozano, N. Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Acta Biológica Colombiana; Vol. 4, núm. 1 (1999); 47-60*
Acta Biológica Colombiana; Vol. 4, núm. 1 (1999); 47-60 1900-1649 0120-548X.
- Chapuis, M. P., y Estoup, A. (2006). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621-631.
- Chavez, D. y Lyrene, P. (2009). Effects of self-pollination and cross-pollination of *Vaccinium darrowii* (Ericaceae) and other low-chill blueberries. *Horticultural Science*, 44(6), 1538-1541.
- Chesnokov, Y. y Artemyeva, A. (2015). Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity. *Сельскохозяйственная биология*, 50(5), 571-578.
- Coba Santamaría, P., Coronel, D., Verdugo, K., Paredes, M. F., Yugsi, E., y Huachi, L. (2012). Estudio etnobotánico del mortiño (*Vaccinium floribundum*) como alimento ancestral y potencial alimento funcional. *LA GRANJA. Revista de Ciencias de la Vida*, 16(2).

- Cobo Andrade, M. M. (2014). *Estudio de diversidad genética de Mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en tres provincias de la Sierra Ecuatoriana Imbabura, Pichincha y Cotopaxi* (Bachelor's thesis, Quito, 2014).
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., Torres, A. F., y de Lourdes Torres, M. (2016). Preliminary analysis of the genetic diversity and population structure of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Biochemical systematics and ecology*, 64, 14-21.
- Cobo, M. M., Gutiérrez, B., y de Lourdes Torres, M. (2018). Regeneration of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) plants through axillary bud culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(1), 112-116.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M. J., y Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador (con extracto de datos)*. Herbario QCA de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador & Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.
- De Vienne, D. (2003). *Molecular markers in plant genetics and biotechnology*. CRC Press.
- Desjardins, P., y Conklin, D. (2010). NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (45).
- Diniz-Filho, J. A. F., Soares, T. N., Lima, J. S., Dobrovolski, R., Landeiro, V. L., Telles, M. P. D. C., y Bini, L. M. (2013). Mantel test in population genetics. *Genetics and molecular biology*, 36(4), 475-485
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D., y Batley, J. (2009). Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatics*, 4(1), 16-27.
- Echeverry, M. A., y Harper, G. J. (2009). Fragmentación y deforestación como indicadores del estado de los ecosistemas en el Corredor de Conservación Choco-Manabí (Colombia-Ecuador). *Recursos Naturales y Ambiente*, (58).

- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, 5(6), 435.
- Espinosa, J., Moreno, J., Bernal, G. y Prat, C. (2018). *The Soils of Ecuador*. J. Espinosa, J. Moreno, y G. Bernal (Eds.). Springer.
- Frankham, R. (1995). Conservation genetics. *Annual review of genetics*, 29(1), 305-327.
- Futuyma, D. J. (1986). Evolutionary biology. Sinauer Assoc. Inc. Massachusetts.
- Galamb, E. (2004). Taxonomy and Ecology of Woody Plants in North American Forests (Excluding Mexico and Subtropical Florida). JS Fralish and SB Franklin. 2002. John Wiley & Sons, New York. 612 pp. \$100 cloth.-. *Environmental Practice*, 6(1), 86-86.
- Gao, Y., Yin, S., Wu, L., Dai, D., Wang, H., Liu, C., y Tang, L. (2017). Genetic diversity and structure of wild and cultivated *Amorpha paeoniifolia* populations in southwestern China as revealed by RAD-seq. *Scientific reports*, 7(1), 14183.
- Gilbert, K. J., Andrew, R. L., Bock, D. G., Franklin, M. T., Kane, N. C., Moore, J. S., y Vines, T. H. (2012). Recommendations for utilizing and reporting population genetic analyses: the reproducibility of genetic clustering using the program structure. *Molecular Ecology*, 21(20), 4925-4930.
- Gitzendanner, M. y Soltis, P. (2000). Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany*, 87(6), 783-792.
- Guidugli, M., Accoroni, K., Mestriner, M., Contel, E., Martinez, C. y Alzate-Marin, A. (2010). Genetic characterization of 12 heterologous microsatellite markers for the giant tropical tree *Cariniana legalis* (Lecythidaceae). *Genetics and molecular biology*, 33(1), 131-134.
- Guillaume, P., y Jacquemart, A. L. (1999). Early-inbreeding depression in *Vaccinium myrtillus* and *V. vitis-idaea*. *Protoplasma*, 208(1-4), 107-114.

- Gupta, P. K., Varshney, R. K., y Prasad, M. (2002). Molecular markers: principles and methodology. In *Molecular techniques in crop improvement* (pp. 9-54). Springer, Dordrecht.
- Hall, M. L., Samaniego, P., Le Pennec, J. L., y Johnson, J. B. (2008). Ecuadorian Andes volcanism: A review of Late Pliocene to present activity. *Journal of Volcanology and Geothermal Research*, 176(1), 1-6.
- Hamrick, J., Godt, M. y Sherman-Broyles, S. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. In *Population genetics of forest trees* (pp. 95-124). Springer, Dordrecht.
- Hancock, J. F., Lyrene, P., Finn, C. E., Vorsa, N., y Lobos, G. A. (2008). Blueberries and cranberries. In *Temperate fruit crop breeding* (pp. 115-150). Springer, Dordrecht.
- Haq, Q., Hussain, T. y Kumar, A. (2016). Molecular markers: A tool to identify hidden science with especial emphasis on agricultural crops. *International Journal of Biology Research*, 1(5), 50-59.
- Hirai, M., Yoshimura, S., Ohsako, T., y Kubo, N. (2010). Genetic diversity and phylogenetic relationships of the endangered species *Vaccinium sieboldii* and *Vaccinium ciliatum* (Ericaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 287(1-2), 75-84.
- Hofstede, R. G., Groenendijk, J. P., Coppus, R., Fehse, J. C., y Sevink, J. (2002). Impact of pine plantations on soils and vegetation in the Ecuadorian high Andes. *Mountain Research and Development*, 22(2), 159-168.
- Holderegger, R., Kamm, U., y Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 797-807.
- Howell, A. (2008). Update on health benefits of cranberry and blueberry. *IX International Vaccinium Symposium 810* (pp. 779-785).

- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., y Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-623.
- Hummer, K. E. (2013). Manna in winter: indigenous Americans, huckleberries, and blueberries. *HortScience*, 48(4), 413-417.
- Idrees, M., y Irshad, M. (2014). Molecular markers in plants for analysis of genetic diversity: a review. *European academic research*, 2(1), 1513-1540.
- Jacquemart, A. L. (1997). *Vaccinium oxycoccos* L.(*Oxycoccus palustris* Pers.) and *Vaccinium microcarpum* (Turcz. ex Rupr.) Schmalh.(*Oxycoccus microcarpus* Turcz. ex Rupr.). *Journal of ecology*, 85(3), 381-396.
- Jakobsson, M., y Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801-1806.
- Kalia, R. K., Rai, M. K., Kalia, S., Singh, R., y Dhawan, A. K. (2011). Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants. *Euphytica*, 177(3), 309-334.
- Karp, G. (2013). *Cell and molecular biology: concepts and experiments*. John Wiley & Sons.
- Karron, J. (1987). A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology*, 1(1), 47-58.
- Kochian, L. V., Piñeros, M. A., Liu, J., y Magalhaes, J. V. (2015). Plant adaptation to acid soils: the molecular basis for crop aluminum resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 571-598.
- Kron, K. A., Powell, E. A., y Luteyn, J. L. (2002). Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from matK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of Satyria. *American Journal of Botany*, 89(2), 327-336.

- Kumar, P., Gupta, V. K., Misra, A. K., Modi, D. R., y Pandey, B. K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2(4), 141.
- Laenoi, S., Phattarakul, N., Jamjod, S., Yimyam, N., Dell, B., y Rerkasem, B. (2015). Genotypic variation in adaptation to soil acidity in local upland rice varieties. *Plant Genetic Resources*, 13(3), 206-212.
- Lazrek, F., Roussel, V., Ronfort, J., Cardinet, G., Chardon, F., Aouani, M. E. y Huguet, T. (2009). The use of neutral and non-neutral SSRs to analyse the genetic structure of a Tunisian collection of *Medicago truncatula* lines and to reveal associations with eco-environmental variables. *Genetica*, 135(3), 391.
- Leimu, R., Vergeer, P., Angeloni, F. y Ouborg, N. (2010). Habitat fragmentation, climate change, and inbreeding in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), 84-98.
- Levy, E., Byrne, M., Coates, D., Macdonald, B., McArthur, S. y Van Leeuwen, S. (2016). Contrasting influences of geographic range and distribution of populations on patterns of genetic diversity in two sympatric Pilbara Acacias. *PloS one*, 11(10), e0163995.
- Lila, M. (2011). Impact of bioflavonoids from berryfruits on biomarkers of metabolic syndrome. *Functional Foods in Health and Disease*, 1(2), 13-24.
- Lin, Y., Chen, Y., Yi, C., Fong, J. J., Kim, W., Rius, M., y Zhan, A. (2017). Genetic signatures of natural selection in a model invasive ascidian. *Scientific reports*, 7, 44080.
- Linhart, Y. B., y Gehring, J. L. (2003). Genetic variability and its ecological implications in the clonal plant *Carex scopulorum* Holm. in Colorado tundra. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 35(4), 429-433.
- Llavisaca, S., Manzano, P., Ruales, J., Flores, J., Mendoza, J., Peralta, E. y Cevallos-Cevallos, J. (2018). Chemical, antimicrobial, and molecular characterization of mortiño

- (*Vaccinium floribundum* Kunth) fruits and leaves. *Food science & nutrition*, 6(4), 934-942.
- Luby, J. J., Ballington, J. R., Draper, A. D., Pliszka, K. y Austin, M. E. (1991). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Genetic Resources of Temperate Fruit and Nut Crops* 290, 393-458.
- Luteyn, J. L. y Balslev, H. (Eds.). (1992). *Páramo: an Andean ecosystem under human influence* (p. 1). London, UK: Academic Press.
- Luteyn, J. (1996). *Flora of Ecuador*. No. 54. 147 Ericaceae. Goetborg.
- Luteyn, J. (1999). A checklist of a plant diversity, geographical distribution and botanical literature. *Memoirs of the New York Botanical Garden*. Vol, 84.
- Luteyn, J. L. (2002). Diversity, adaptation, and endemism in neotropical Ericaceae: biogeographical patterns in the Vaccinieae. *The Botanical Review*, 68(1), 55-87.
- Lyrene, P. M., y Perry, J. L. (1988). Blueberries (*Vaccinium* spp.). In *Crops II* (pp. 181-198). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Magnitskiy, S., Ligarreto, M. y Lancheros, H. (2011). Rooting of two types of cuttings of fruit crops *Vaccinium floribundum* Kunth and *Disterigma alaternoides* (Kunth) Niedenzu (Ericaceae). *Agronomía Colombiana*, 29(2), 390-396.
- Maiz-Tome, L. (2016). *Vaccinium macrocarpon*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2016. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T64326218A67731192>.
- Matthews Jr, J. V., y Oviden, L. E. (1990). Late Tertiary plant macrofossils from localities in Arctic/Subarctic North America: a review of the data. *Arctic*, 364-392.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. (2019). Sigchos produce y comercializa vino de mortiño. Recuperado 01 de marzo del 2019 de <https://www.agricultura.gob.ec/sigchos-produce-y-comercializa-vino-de-mortino/>

- Moose, S. P., y Mumm, R. H. (2008). Molecular plant breeding as the foundation for 21st century crop improvement. *Plant physiology*, 147(3), 969-977.
- Moreno, J., Yerovi, F., Herrera, M., Yáñez, D., y Espinosa, J. (2018). Soils from the Highlands. In *The Soils of Ecuador* (pp. 79-111). Springer, Cham.
- Moreta, M. (2016). En Sigchos se elabora vino de mortiño. *Revista Líderes*, Quito, Ecuador.
- Murray, M. C., y Hare, M. P. (2006). A genomic scan for divergent selection in a secondary contact zone between Atlantic and Gulf of Mexico oysters, *Crassostrea virginica*. *Molecular Ecology*, 15(13), 4229-4242.
- Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A., Hegedűs, G. y Taller, J. (2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50(9-10), 670-672.
- Nazareno, A., Pereira, R., Feres, J., Mestriner, M. y Alzate-Marin, A. (2009). Transferability and characterization of microsatellite markers in two Neotropical *Ficus* species. *Genetics and molecular biology*, 32(3), 568-571.
- Nestby, R., Percival, D., Martinussen, I., Opstad, N., y Rohloff, J. (2011). The European blueberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and the potential for cultivation. *European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 5, 5-16.
- Nielsen, E. E., Hansen, M. M. y Meldrup, D. (2006). Evidence of microsatellite hitch-hiking selection in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.): implications for inferring population structure in nonmodel organisms. *Molecular Ecology*, 15(11), 3219-3229.
- Onoda, Y. y Anten, N. P. (2011). Challenges to understand plant responses to wind. *Plant signaling & behavior*, 6(7), 1057-1059.
- Ortiz, J., Marín-Arroyo, M. R., Noriega-Domínguez, M. J., Navarro, M., y Arozarena, I. (2013). Color, phenolics, and antioxidant activity of blackberry (*Rubus glaucus* Benth.),

- blueberry (*Vaccinium floribundum* Kunth.), and apple wines from Ecuador. *Journal of food science*, 78(7), C985-C993.
- Pedraza-Peñalosa, P., y Luteyn, J. L. (2011). Andean *Vaccinium* (Ericaceae: Vaccinieae): Seven new species from South America. *Brittonia*, 63(2), 257-275.
- Peng, Y., Macek, P., Macková, J., Romoleroux, K., y Hensen, I. (2015). Clonal Diversity and Fine-scale Genetic Structure in a High Andean Treeline Population. *Biotropica*, 47(1), 59-65.
- Perez-Marquez J (2014) SQPrimer: The Utility of Designing Homologous Primers for the Genetic Analysis Based on the PCR. *J Comput Sci Syst Biol* 7: 229-234. doi:10.4172/jcsb.1000162
- Powell, E. A., y Kron, K. A. (2002). Hawaiian blueberries and their relatives—a phylogenetic analysis of *Vaccinium* sections *Macropelma*, *Myrtillus*, and *Hemimyrtillus* (Ericaceae). *Systematic Botany*, 27(4), 768-780.
- Prencipe, F. P., Bruni, R., Guerrini, A., Rossi, D., Benvenuti, S., y Pellati, F. (2014). Metabolite profiling of polyphenols in *Vaccinium* berries and determination of their chemopreventive properties. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 89, 257-267.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Qu, Y., Luo, X., Zhang, R., Song, G., Zou, F., y Lei, F. (2011). Lineage diversification and historical demography of a montane bird *Garrulax elliotii*-implications for the Pleistocene evolutionary history of the eastern Himalayas. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 174.
- Ramón, G. (2002). Visiones, usos e intervenciones en los páramos del Ecuador. *Páramos y Cultura. Serie Páramo*, 12.

- Ramsay, P. (2001). The zonal páramo vegetation of Volcán Chiles. *The Ecology of Volcán Chiles: high-altitude ecosystems on the Ecuador-Colombia border*, 27-38.
- Ramsay, P. M., y Oxley, E. R. B. (1996). Fire temperatures and postfire plant community dynamics in Ecuadorian grass páramo. *Vegetatio*, 124(2), 129-144.
- Retamales, J. B., y Hancock, J. F. (2018). The Blueberry Industry. *Blueberries*. Boston: Cabi.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137-138.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., y Leemans, R. (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *science*, 287(5459), 1770-1774.
- Salgado-Labouriau, M., Rull, V., Schubert, C. y Va, S. (1988). The establishment of vegetation after Late Pleistocene deglaciation in the Páramo de Miranda, Venezuelan Andes. *Review of Palaeobotany and palynology*, 55(1-3), 5-17.
- Sampson, J. F., Byrne, M., Gibson, N. y Yates, C. (2016). Limiting inbreeding in disjunct and isolated populations of a woody shrub. *Ecology and evolution*, 6(16), 5867-5880.
- Schlautman, B., Fajardo, D., Bougie, T., Wiesman, E., Polashock, J., Vorsa, N., y Zalapa, J. (2015). Development and validation of 697 novel polymorphic genomic and EST-SSR markers in the American cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.). *Molecules*, 20(2), 2001-2013.
- Schreckinger, M. E., Lotton, J., Lila, M. A., y de Mejia, E. G. (2010). Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. *Journal of medicinal food*, 13(2), 233-246.
- Schreckinger, M., Lila, M. A., Yousef, G., y de Mejia, E. (2012). Inhibition of α -glucosidase and α -amylase by *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis* proanthocyanidins. *Clinical trials*, 4, 7.

- Semagn, K., Bjørnstad, Å., y Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African journal of biotechnology*, 5(25).
- Sheng, Y., Zheng, W., Pei, K. y Ma, K. (2005). Genetic variation within and among populations of a dominant desert tree *Haloxylon ammodendron* (Amaranthaceae) in China. *Annals of Botany*, 96(2), 245-252.
- Shi, M. M., Michalski, S. G., Chen, X. Y., y Durka, W. (2011). Isolation by elevation: genetic structure at neutral and putatively non-neutral loci in a dominant tree of subtropical forests, *Castanopsis eyrei*. *PLoS One*, 6(6), e21302.
- Sitther, V., Zhang, D., Harris, D. L., Yadav, A. K., Zee, F. T., Meinhardt, L. W., y Dhekney, S. A. (2014). Genetic characterization of guava (*Psidium guajava* L.) germplasm in the United States using microsatellite markers. *Genetic resources and crop evolution*, 61(4), 829-839.
- Sklenář, P., y Balslev, H. (2005). Superpáramo plant species diversity and phylogeography in Ecuador. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 200(5), 416-433.
- Sundqvist, L., Keenan, K., Zackrisson, M., Prodöhl, P., y Kleinhans, D. (2016). Directional genetic differentiation and relative migration. *Ecology and Evolution*, 6(11), 3461-3475.
- Taylor, S., Bykova, N. V., Igamberdiev, A. U., y Debnath, S. C. (2017). Structural pattern and genetic diversity in blueberry (*Vaccinium*) clones and cultivars using EST-PCR and microsatellite markers. *Genetic resources and crop evolution*, 64(8), 2071-2082.
- Vasco, C., Rihnen, K., Ruales, J., y Kamal-Eldin, A. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth). *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 57, 8274–8281.

- Vieira, M. L. C., Santini, L., Diniz, A. L., y Munhoz, C. D. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genetics and molecular biology*, 39(3), 312-328.
- Wang, C., Schroeder, K. y Rosenberg, N. (2012). A maximum-likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, 192(2), 651-669.
- Wesche, K., Hensen, I., y Undrakh, R. (2006). Genetic structure of *Galitzkya macrocarpa* and *G. potaninii*, two closely related endemics of Central Asian mountain ranges. *Annals of botany*, 98(5), 1025-1034.
- Wigginton, J. E., Cutler, D. J., y Abecasis, G. R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *The American Journal of Human Genetics*, 76(5), 887-893.
- Wilbur, R. L., y Luteyn, J. L. (2008). A synopsis of the Mexican and Central American species of *Vaccinium* (Ericaceae). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*, 207-241.
- Young, A., Boyle, T., y Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in ecology & evolution*, 11(10), 413-418.
- Zalapa, J. E., Bougie, T. C., Bougie, T. A., Schlautman, B. J., Wiesman, E., Guzman, A., y Smith, T. (2015). Clonal diversity and genetic differentiation revealed by SSR markers in wild *Vaccinium macrocarpon* and *Vaccinium oxycoccos*. *Annals of applied biology*, 166(2), 196-207.
- Zemlak, T. S., Habit, E. M., Walde, S. J., Battini, M. A., Adams, E. D., y Ruzzante, D. E. (2008). Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology*, 17(23), 5049-5061.

Zoratti, L., Palmieri, L., Jaakola, L. y Häggman, H. (2015). Genetic diversity and population structure of an important wild berry crop. *AoB Plants*, 7.

12.Tablas

Tabla 1. Resumen de la información proporcionada por 16 marcadores SSR para la caracterización genética del mortíño a lo largo de la sierra ecuatoriana.

Locus	Na	Ho	He	PIC
Mo001	10	0,61	0,82	0,79
Mo002	6	0,39	0,58	0,49
Mo004	9	0,45	0,79	0,77
Mo005	12	0,46	0,87	0,85
Mo007	9	0,35	0,58	0,50
Mo008	11	0,41	0,77	0,74
Mo009	7	0,25	0,59	0,55
Mo010	11	0,32	0,66	0,62
Mo011	6	0,22	0,26	0,26
Mo015	8	0,24	0,63	0,57
Mo016	13	0,45	0,79	0,76
Mo018	9	0,42	0,72	0,69
Mo020	20	0,59	0,89	0,88
Mo021	16	0,49	0,88	0,87
Mo024	12	0,56	0,88	0,87
Mo025	20	0,46	0,91	0,90

Na: número de alelos por locus; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; PIC: Contenido de Información de Polimorfismo.

Tabla 2. Resumen de los parámetros de diversidad para cada localidad en donde se recolectaron individuos de mortiño.

Localidad	N	Na	Npa	Ho	He
El Angel	4	49	-	0,53	0,53
San Gabriel	3	45	2	0,54	0,52
La Cofradia	3	43	-	0,54	0,48
Cuicocha	4	40	1	0,55	0,50
Santa Lucía	3	36	1	0,46	0,42
Cahuasquí	4	40	4	0,47	0,5
Mojanda	4	42	3	0,34	0,46
Cayambe	3	28	2	0,14	0,21
Lloa	4	29	1	0,23	0,27
PNC	4	42	2	0,42	0,46
Quilotoa	4	26	1	0,07	0,21
Sigchos	3	37	-	0,35	0,38
Carihuairazo	5	60	6	0,58	0,60
Tisandeo	5	53	5	0,46	0,50
Cebapamba	4	45	-	0,5	0,47
Salinas	3	42	1	0,58	0,49
Salinas Norte	3	42	1	0,46	0,42
Quimiac	7	65	5	0,55	0,60
Surimpalti	4	51	-	0,36	0,53
Cerro Abuga	3	39	1	0,52	0,46
San Miguel	3	45	1	0,48	0,5
Toreadora	4	34	2	0,09	0,36
Cajas	3	26	1	0,1	0,24
Cruces	3	28	3	0,06	0,28
Saraguro	3	41	1	0,52	0,48
Podocarpus	4	51	4	0,61	0,54
Santiago	3	48	5	0,56	0,52

N: número de individuos en la localidad; Na: número de alelos por localidad; Npa: número de alelos privados por localidad; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

Tabla 3. Comparación de los valores *pairwise* Fst entre las cuatro regiones analizadas.

	Región 1	Región 2	Región 3
Región 2	0,056	-	-
Región 3	0,073	0,081	-
Región 4	0,102	0,153	0,162

Tabla 4. Comparación de los valores *pairwise* Fst entre las 4 localidades encontradas dentro de la región 4.

	Toreadora	Cajas	Cruces
Cajas	0,110	-	-
Cruces	0,144	0,191	-
Quilotoa	0,260	0,366	0,355

Tabla 5. Valores para estimación del K óptimo a partir del análisis en STRUCTURE con información previa de localidad y provincia de origen de las muestras de mortiño.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	 Ln''(K) 	Delta K
3	10	-4796.425	0.9500	283.750000	56.500000	59.473684
4	10	-4569.1750	1.0595	227.250000	117.475000	110.879760
5	10	-4459.4000	2.0510	109.775000	40.025000	19.514718

K: número de clústers evaluados; Reps: número de repeticiones corridas; Mean LnP(K): promedio del logaritmo natural de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Stdev LnP(K): desviación estándar del logaritmo natural de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Ln'(K): derivada de primer orden de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Ln''(K): derivada de segundo orden de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Delta K: tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos.

13.Figuras

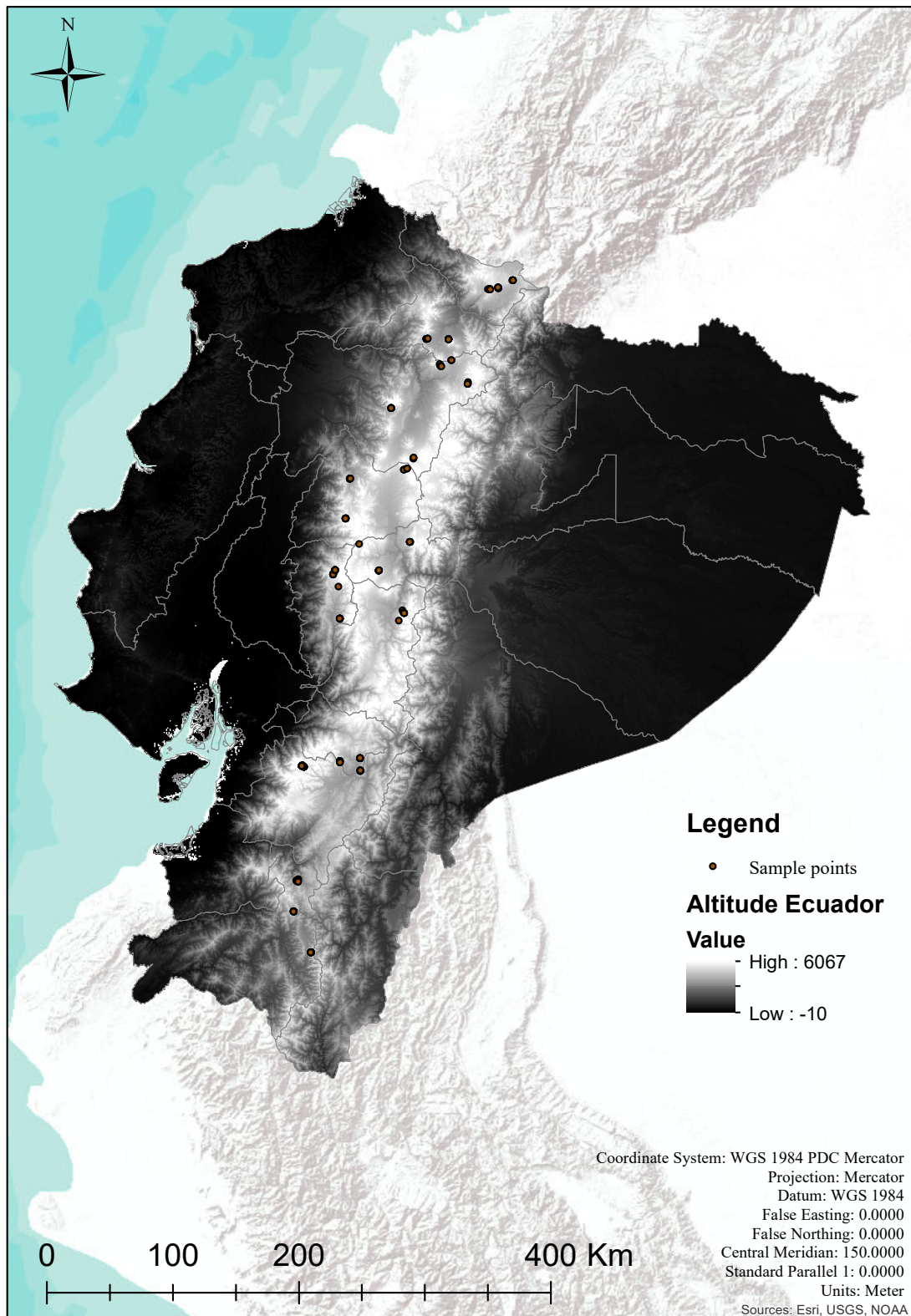


Figura 1. Mapa georreferenciado de las 27 localidades de la sierra ecuatoriana (puntos naranjas) en donde se recolectaron las muestras de mortiño analizadas en este estudio. Elaborado por Izán Chalén.

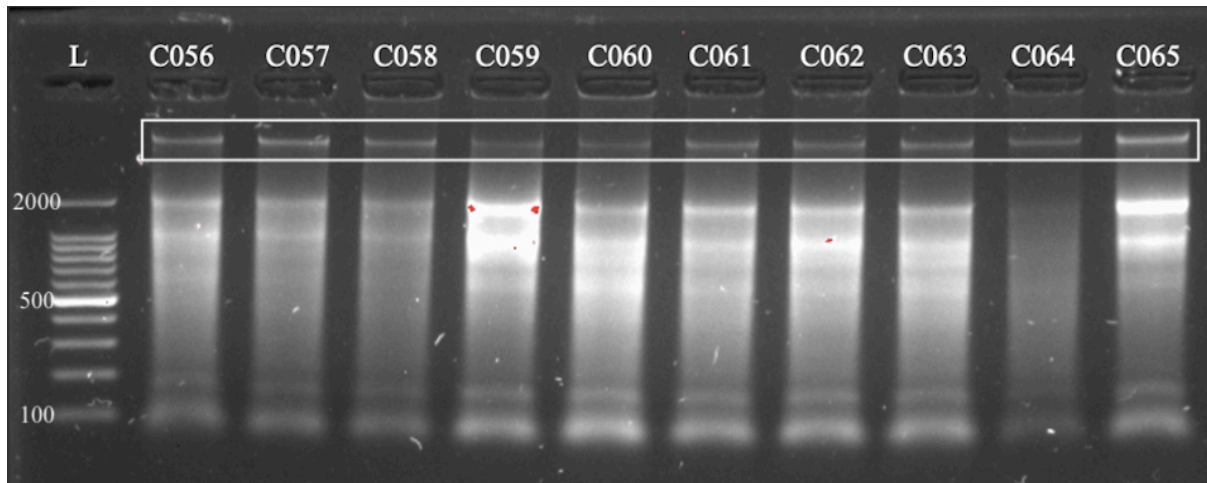


Figura 2. Electroforesis en gel agarosa al 1% de muestras de ADN extraído a partir de hojas de mortiño de Cotopaxi. Dentro del cuadro blanco se observan bandas de ADN de alto peso molecular en todas las muestras. Ladder:100 bp (Invitrogen).

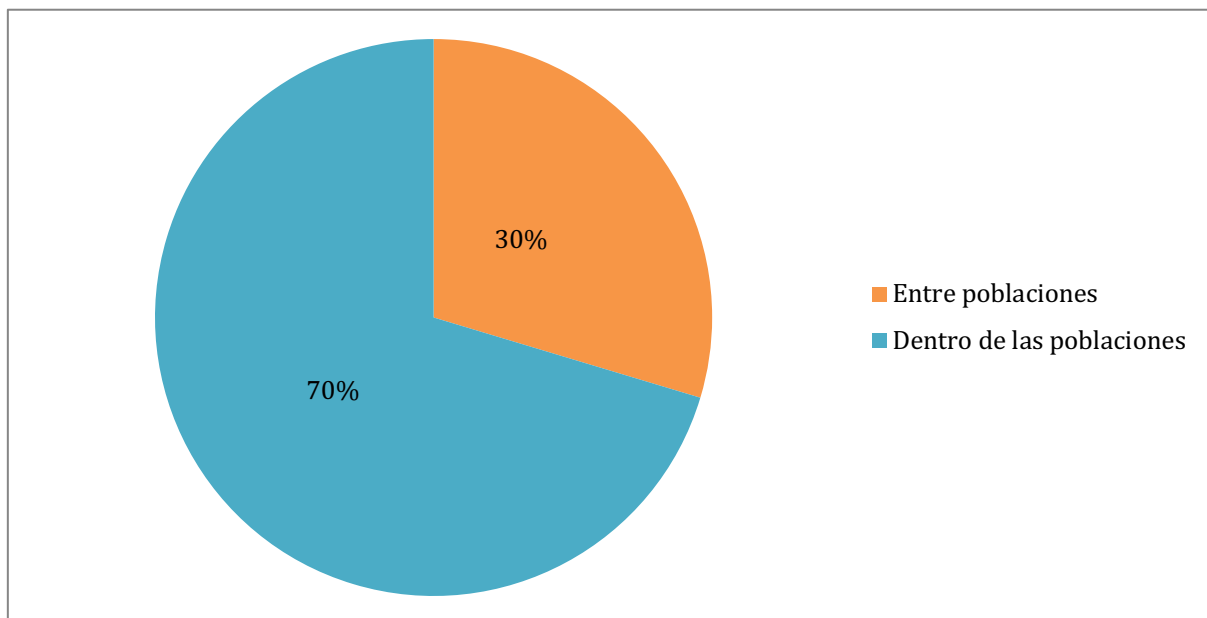


Figura 3. Análisis de varianza molecular (AMOVA) representada en función de la distribución de la diversidad genética del mortiño entre poblaciones (interpoblacional) y dentro de las poblaciones (intrapoblacional). La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos entre las 27 localidades muestreadas. La variación genética dentro de las poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos dentro de que cada localidad muestreada.

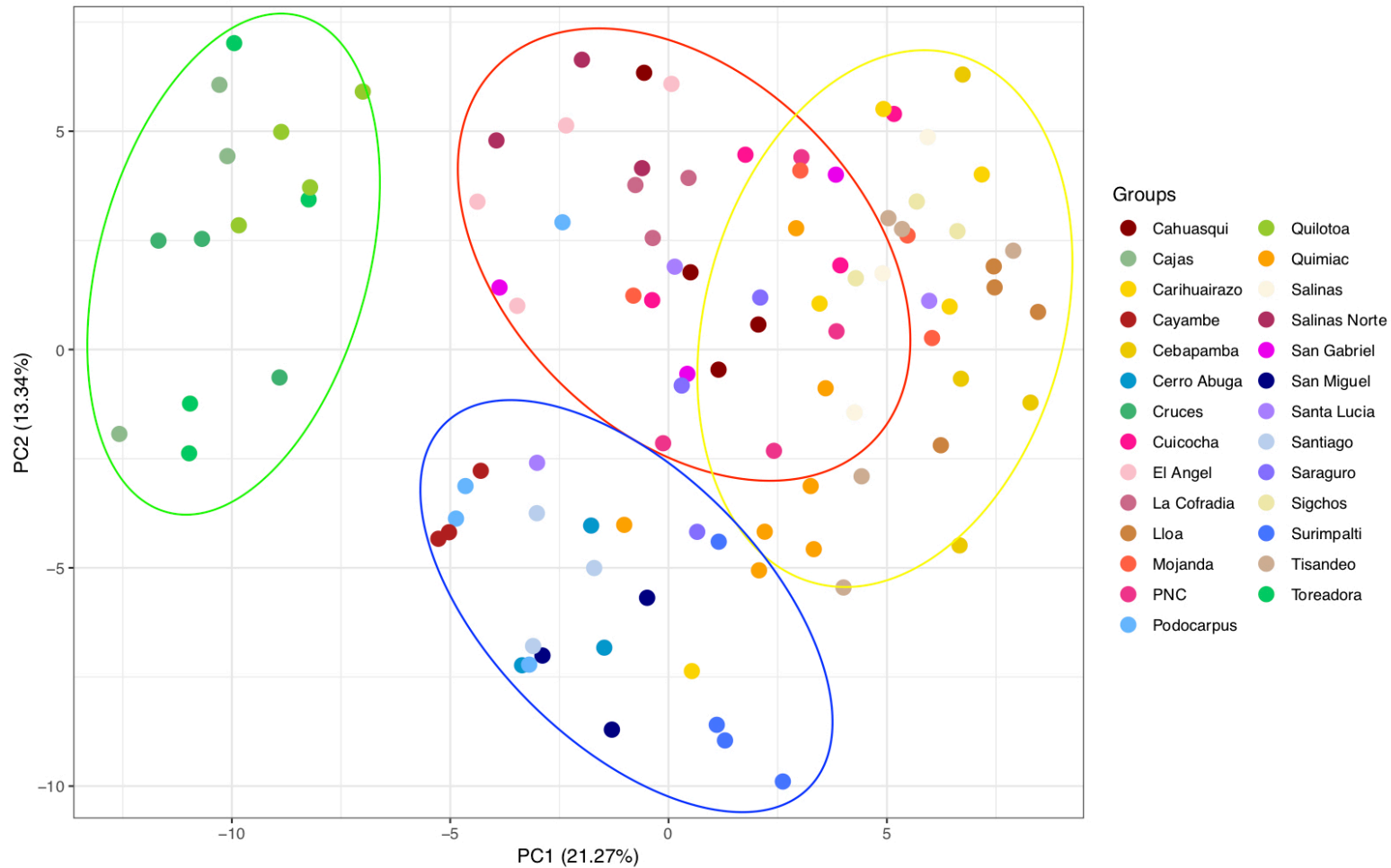


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCoA) bidimensional, de 100 individuos de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) utilizando datos de diversidad genética de 16 marcadores SSR. Se sugieren 4 posibles clústers genéticos que están representados en color rojo (individuos del norte de la sierra ecuatoriana), amarillo (individuos del centro), azul (individuos del sur) y verde (individuos de Quilotoa y localidades de Azuay).

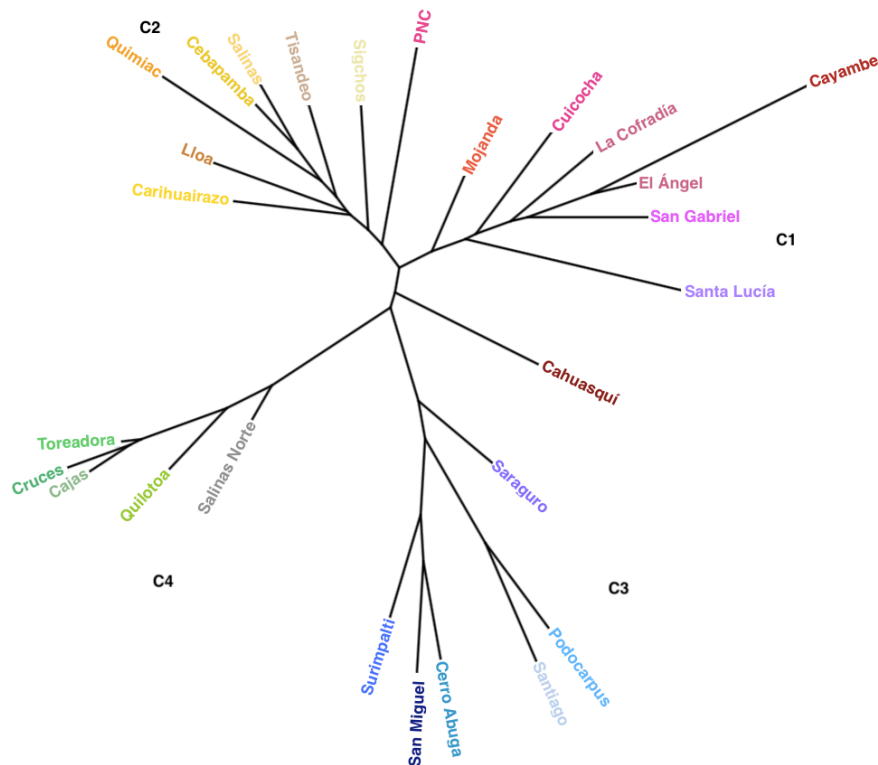


Figura 5. Dendrograma Neighbor Joining (NJ) por localidades de muestreo de individuos de *V. floribundum* en la sierra ecuatoriana. El dendrograma NJ representa a través de la longitud de las ramas, las distancias genéticas halladas entre los individuos de las distintas localidades.

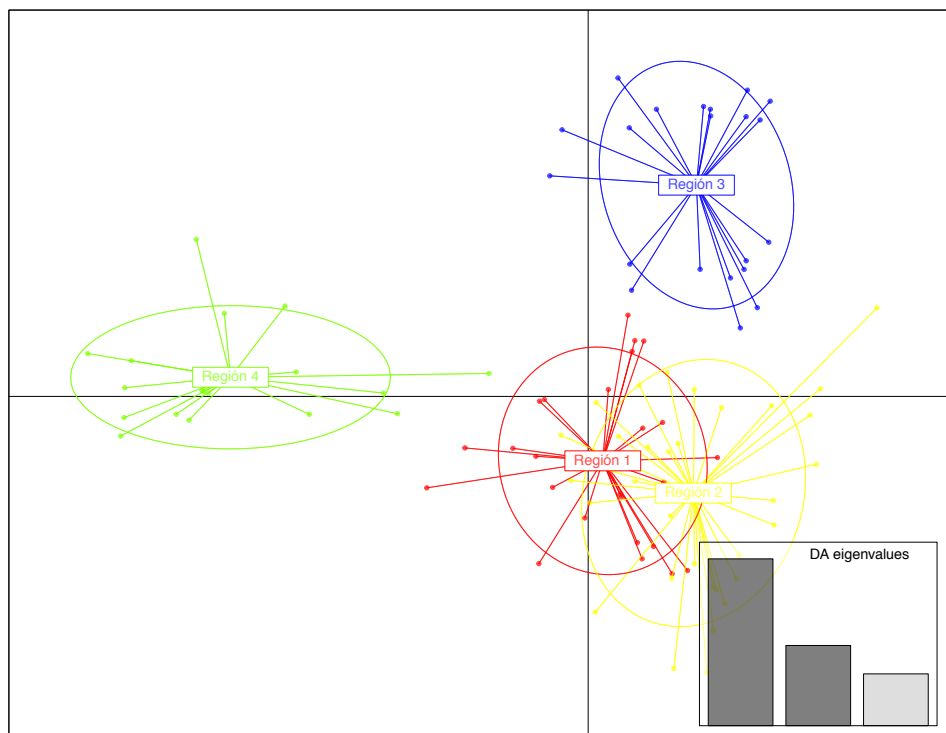


Figura 6. Ilustración de los cuatro clústers (regiones) en los que el DAPC agrupó a los individuos de *V. floribundum* muestreados en la sierra ecuatoriana. Cada punto representa a un individuo, y cada elipse y color representa un clúster. Los DA eigenvalues (3) indican la relación entre y dentro de la varianza de los componentes principales (PC), utilizando combinaciones lineales.

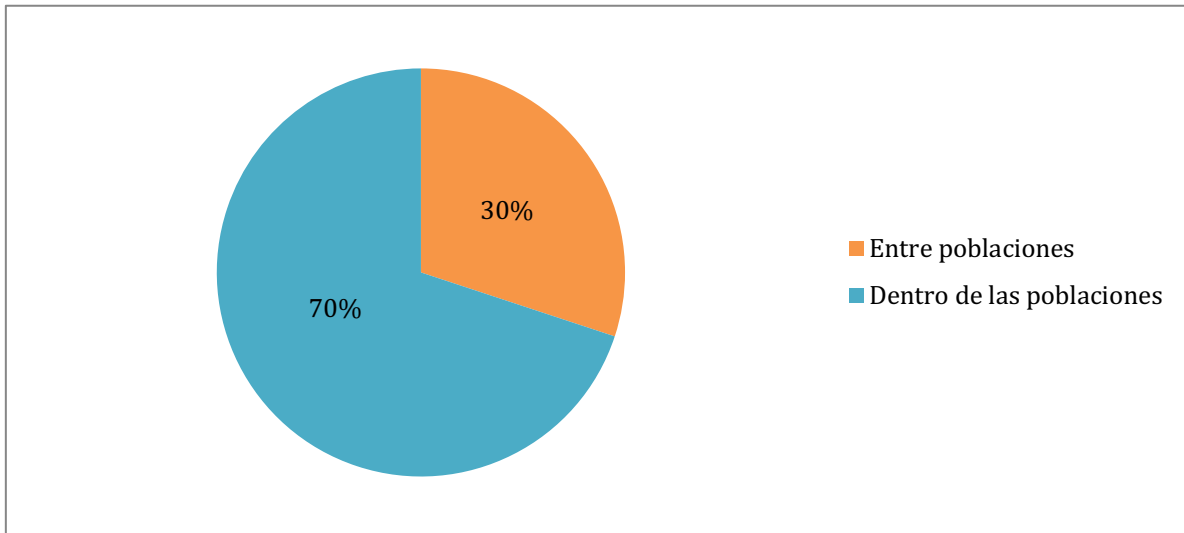


Figura 7. Análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro de la región 4, representada en función de la distribución de la diversidad genética del mortño entre poblaciones (interpoblacional) y dentro de las poblaciones (intrapoblacional). La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos entre las 4 localidades de la región 4 (Quilotoa, Toreadora, Cajas y Cruces). La variación genética dentro de las poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos dentro de cada una de las 4 localidades.

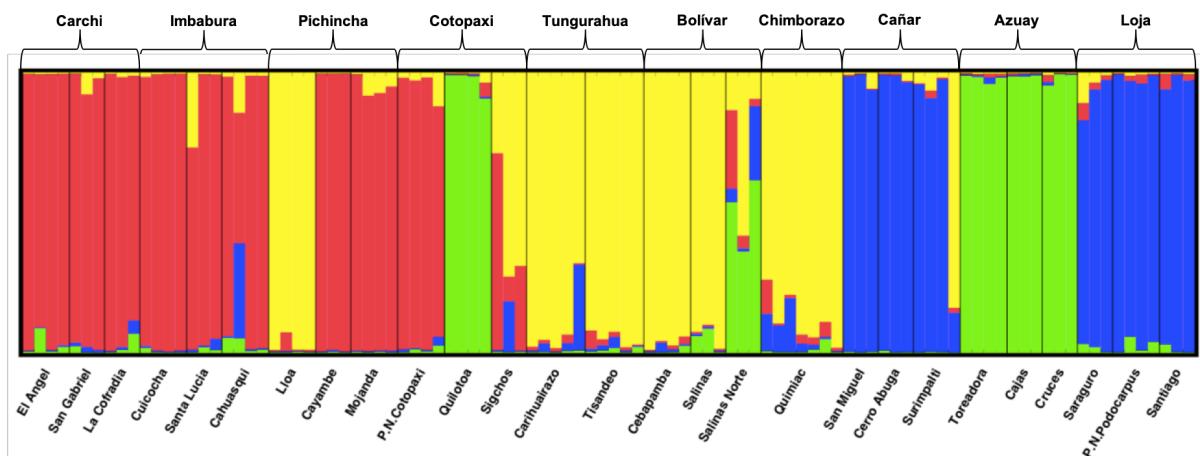


Figura 8. Q-plot que muestra el agrupamiento bayesiano de 100 individuos ($K = 4$). El valor K es el número de acervos representados por diferentes colores. Rojo: grupo norte; amarillo: grupo centro; azul: grupo sur; y verde: grupo altitudinal.

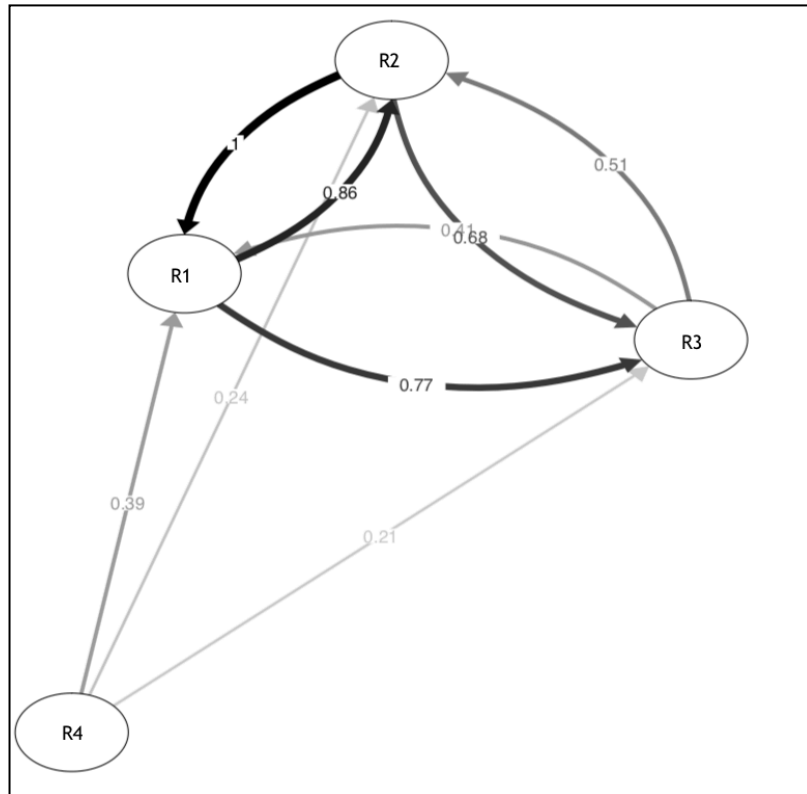


Figura 9. Red de migración entre las cuatro regiones analizadas. La proximidad de los círculos es directamente proporcional a la similitud genética de las regiones. Las líneas de conexión reflejan la magnitud relativa y la dirección de la migración y el flujo génico entre las regiones. Valores cercanos a 1 y líneas más oscuras se asocian a mayores niveles de flujo génico.

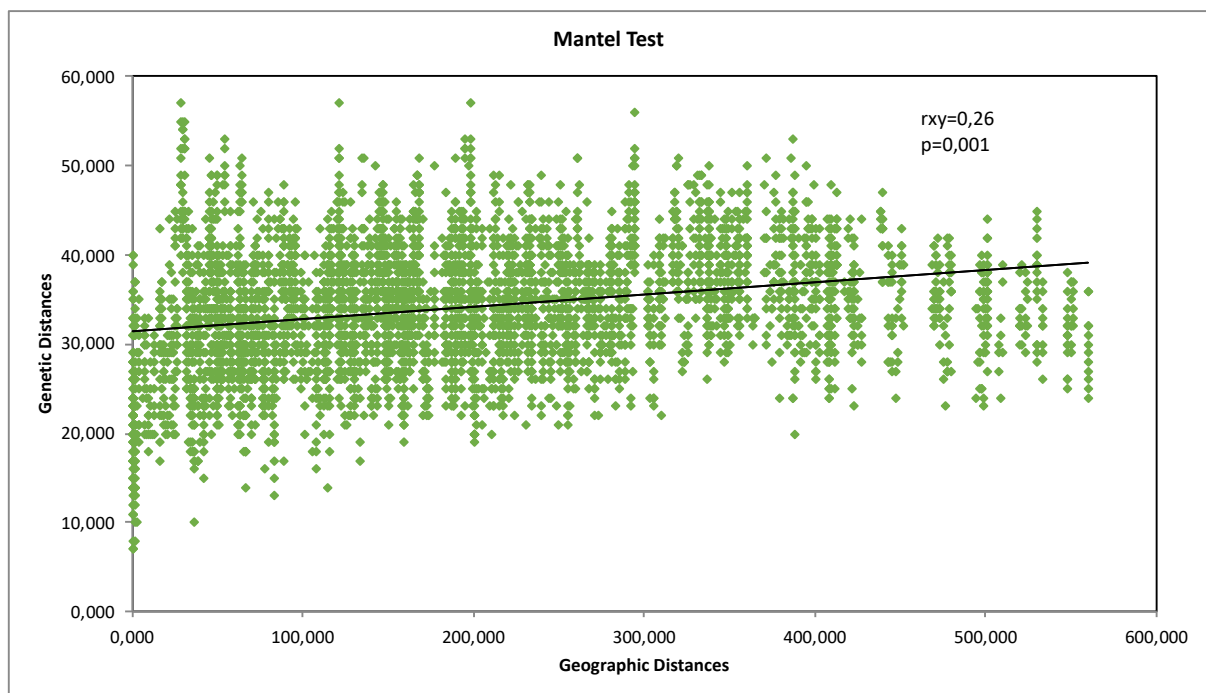


Figura 10. Gráfico de dispersión para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de cada par de individuos de mortño de la muestra en estudio, mediante una prueba de Mantel pareada. rxy: coeficiente de correlación. P: significancia.



Figura 11. Individuos de mortiño muestreados en el estudio. En la primera imagen (izquierda) se muestra una planta de mortiño rastrera, desarrollada a la misma altura que el pajonal, en el Parque Nacional Cajas. En la segunda imagen (derecha) se presenta un arbusto de mortiño con frutos, en el Parque Nacional Cotopaxi. Fotografías tomadas por Andrea Pinos y Pamela Vega.

14. Anexos

Anexo A. Permisos de movilización obtenidos por el Ministerio del Ambiente (MAE) de las 10 provincias de la sierra ecuatoriana.

Provincia	Número del permiso de recolección
Carchi	MAE-DPAC-2017-0891-O
Imabura	MAE-CGZ1-DPAI-2017-1065-O
Pichincha	006-FLO-2018-DPAP-MA
Cotopaxi	07
Tungurahua	11-2017-DPAT-V.S
Bolívar	001-2018-MOV-FLO-DPAB-MAE
Chimborazo	009-2017
Cañar	003-FLO-DPC-B-MA
Azuay	096-DPA-MA-2017
Loja	018-2017-UPN-VS-DPAL-MAE

Anexo B. Loci microsatélites empleados como marcadores moleculares en este estudio (Argudo, 2017).

Primer	Secuencia de los primers (5'-3')	Fluoróforo	T annealing	Motivo	Tamaño esperado
Mo001	F: AACCTGTACAAGTCTACCCCTACCG R: TAATAACAGAACATCAGTGCAAGGC	VIC	58	TTCCTG(48)	300 - 400
Mo002	F: CAAAATAACCCTCAAACACACACC R: TTTATCATTATCCTACAGCGTCACC	PET	58	TTTGG(50)	100 - 200
Mo004	F: GAGGTATTGGAATCCTTGGATGG R: CTCTCCCCTCAACTCTTCCC	PET	58	TCC(33)	300 - 400
Mo005	F: TAGAGATTCATCTCCATCCTTTTGC R: GTCCATTAGGGTTCCAAAAGTGC	FAM	58	ACC(33)	200 - 300
Mo007	F: GAAGCCTGGTCAGTCCTTCC R: CACTAGGAGTCTGACTTTCCTCTGC	PET	63	TGC(24)	200 - 300
Mo008	F: ACTACCCTGCCACTCTCACTACC R: CGGACCCAGAGTTAGGATAAATACC	VIC	63	ACC(27)	300 - 400
Mo009	F: TATTCTTATGTTTCGTCCTCGTAGGC R: TTTCTGCTAGCTGTTGTTGTAACG	NED	63	AGT(24)	400 - 500
Mo010	F: TAGACAACCACTTTCTTTGGTTTCC R: AATAAGTCTTGCTTTGTACCTTGCC	NED	63	TTC(30)	250 - 350
Mo011	F: GCGAGAGTATTGGTGTTTCATGC R: CAGGTATAGATATACTGGGTTTTGAGG	VIC	58	TTC(24)	300 - 400
Mo015	F: TAAATCCAAAAGGACAACCTCCATCC R: AACATGGGTTTAGCGTAGGAGACG	NED	60	TTC(27)	200 - 300
Mo016	F: GAAGAAGAAATGGTGAGACAACCTGC R: AAGAAGATTGACTAGGGAGACATCG	FAM	60	TTC(33)	350 - 450
Mo018	F: ATTCGGGTATGGAGAGAGAAAGAGG R: ACACCAACAAACCCGAAAATAACC	NED	60	TCC(27)	200 - 300
Mo020	F: CTACATTTTACCCGGTCACTTTTGC R: CACTAGTTACAAGAGCATTTTCCC	PET	60	ATT(33)	300 - 400
Mo021	F: CATGGTTTGGTCTAGTTGATAACCC R: GATGCTTCTAGAGCCTTTATTGC	FAM	60	TTC(33)	300 - 400
Mo024	F: TGTTGCTTCTTTTGTTCCTACCC R: TTAGAGTTCTAAGCCAACAAACTCG	VIC	60	ATC(24)	300 - 400
Mo025	F: GGTCAAAGGAGGAGAATAATAGCC R: TGTCTCTGCCATTTTAATGTTACC	FAM	60	TTC(54)	250-350

Anexo C. Localidades de los 100 individuos de *V. floribundum* incluidos en este estudio, que se colectaron en las salidas de campo entre mayo del 2017 a agosto del 2018. Se indican las coordenadas y la altitud (en msnm) de cada individuo recolectado.

Provincia	Localidad	Individuo	Coordenadas	Altitud
Carchi	El Ángel	CA001	N0° 38.765' W77° 54.726'	3317
		CA002	N0° 38.708' W77° 54.367'	3357
		CA004	N0° 38.784' W77° 54.208'	3387
		CA008	N0° 38.784' W77° 53.922'	3388
	San Gabriel	CA011	N0° 39.066' W77° 50.265'	3405
		CA014	N0° 39.256' W77° 50.344'	3459
		CA020	N0° 39.563' W77° 50.456'	3489
	La Cofradía	CA022	N0° 42.590' W77° 44.207'	3255
		CA025	N0° 42.549' W77° 44.099'	3248
		CA027	N0° 42.541' W77° 44.020'	3250
Imbabura	Cuicocha	I047	N0° 17.3645' W78° 21.0815'	3084
		I050	N0° 17.3782' W78° 20.6979'	3090
		I051	N0° 17.3885' W78° 20.5768'	3100
		I053	N0° 17.4311' W78° 20.5298'	3122
	Santa Lucía	I054	N0° 17.266' W78° 11.634'	2996
		I056	N0° 17.235' W78° 11.601'	2996
		I063	N0° 17.109' W78° 11.600'	3062
	Cahuasquí	I065	N0° 34.188' W78° 16.574'	3599
		I068	N0° 34.223' W78° 16.599'	3599
		I071	N0° 34.229' W78° 16.619'	3594
		I073	N0° 33.941' W78° 16.153'	3714
Pichincha	Mojanda	P064	N0° 05.950' W78° 15.204'	3770
		P066	N0° 06.011' W78° 15.282'	3805
		P071	N0° 05.615' W78° 14.990'	3669
		P073	N0° 05.465' W78° 14.719'	3596
	Cayambe	P051	S0° 02.056' W78° 03.364'	3741
		P052	S0° 01.278' W78° 03.205'	3885
		P055	S0° 02.062' W78° 03.563'	3732
	Lloa	P044	S0° 12.451' W78° 36.025'	3450
		P045	S0° 12.459' W78° 36.086'	3475
		P046	S0° 12.494' W78° 36.131'	3535
P050		S0° 12.450' W78° 36.222'	3546	
Cotopaxi	Parque Nacional Cotopaxi	C047	S0° 38.997' W78° 30.680'	3558
		C049	S0° 38.558' W78° 29.309'	3803
		C052	S0° 34.174' W78° 26.657'	3702
		C055	S0° 33.864' W78° 26.520'	3687
	Quilotoa	C056	S0° 59.966' W78° 55.618'	4090
		C059	S1° 00.023' W78° 55.639'	4126

		C062	S1° 00.062' W78° 55.662'	4126		
		C065	S1° 00.089' W78° 55.677'	4120		
	Sigchos	C067	S0° 42.847' W78° 53.784'	3136		
		C071	S0° 42.951' W78° 53.888'	3163		
		C075	S0° 42.838' W78° 53.651'	3118		
		T001	S1° 22.448' W78° 41.481'	3757		
		T003	S1° 22.434' W78° 41.466'	3742		
Tungurahua	Carihuairazo	T004	S1° 22.465' W78° 41.510'	3768		
		T006	S1° 22.342' W78° 41.435'	3709		
		T007	S1° 22.361' W78° 41.390'	3656		
		T009	S1° 10.120' W78° 28.187'	3565		
		T010	S1° 10.113' W78° 28.120'	3555		
	Tisandeo	T011	S1° 10.115' W78° 28.094'	3561		
		T013	S1° 10.129' W78° 28.164'	3552		
		T015	S1° 10.143' W78° 28.196'	3552		
		Cebapamba	B001	S1° 43.219' W78° 58.081'	3282	
			B005	S1° 43.176' W78° 58.135'	3267	
B007	S1° 43.138' W78° 58.155'		3251			
B008	S1° 43.122' W78° 58.167'		3243			
Bolívar	Salinas	B011	S1° 24.104' W79° 01.028'	3643		
		B015	S1° 24.065' W79° 01.001'	3651		
		B017	S1° 24.114' W79° 01.036'	3630		
	Salinas Norte	B019	S1° 22.215' W79° 00.183'	4038		
		B021	S1° 22.201' W79° 00.176'	4055		
		B026	S1° 22.194' W79° 00.165'	4057		
Chimborazo	Quimiac	H001	S1° 44.033' W78° 32.869'	3482		
		H002	S1° 39.564' W78° 31.331'	3609		
		H003	S1° 40.415' W78° 30.992'	3684		
		H005	S1° 40.721' W78° 30.578'	3744		
		H007	S1° 40.762' W78° 30.561'	3745		
		H008	S1° 40.810' W78° 30.624'	3749		
		H009	S1° 40.851' W78° 30.637'	3758		
		Cañar	Surimpalti	U021	S2° 44.516' W78° 58.143'	3050
				U024	S2° 44.479' W78° 58.154'	3055
U026	S2° 44.455' W78° 58.156'			3065		
U030	S2° 45.018' W78° 58.132'			3015		
Cerro Abuga	U012		S2° 43.248' W78° 49.433'	3034		
	U019		S2° 43.238' W78° 49.429'	3049		
	U020		S2° 43.183' W78° 49.423'	3120		
San Miguel	U003		S2° 48.736' W78° 49.297'	3062		
	U006		S2° 48.520' W78° 49.357'	3086		
	U010		S2° 48.450' W78° 49.320'	3100		

Azuay	Toreadora	A002	S2° 46.980' W79° 13.436'	3940
		A003	S2° 46.989' W79° 13.442'	3940
		A006	S2° 46.951' W79° 13.536'	3947
		A010	S2° 46.923' W79° 13.592'	3956
	Cajas	A011	S2° 46.520' W79° 14.244'	4057
		A013	S2° 46.468' W79° 14.265'	4061
		A019	S2° 46.367' W79° 14.203'	4094
	Cruces	A022	S2° 46.607' W79° 14.474'	4160
		A027	S2° 46.618' W79° 14.477'	4159
		A030	S2° 46.604' W79° 14.447'	4152
Loja	Saraguro	L001	S3° 35.295' W79° 15.954'	2891
		L008	S3° 35.920' W79° 16.607'	3008
		L010	S3° 36.397' W79° 15.913'	2900
	Podocarpus	L011	S4° 06.727' W79° 10.407'	3048
		L015	S4° 06.714' W79° 10.466'	3065
		L017	S4° 06.703' W79° 10.498'	3067
		L020	S4° 06.718' W79° 10.574'	3039
		L022	S3° 49.229' W79° 17.904'	2874
	Santiago	L026	S3° 49.178' W79° 17.906'	2889
		L030	S3° 49.139' W79° 17.931'	2906

Anexo D. Genotipado de los 100 individuos de *V. floribundum* de la sierra ecuatoriana, seleccionados para este estudio. Se muestran los genotipos de los 16 loci microsatélites. Los diferentes alelos están denotados según su tamaño en pb y separados por un guion (“-”).

	M001	M002	M004	M005	M007	M008	M009	M010	M011	M015	M016	M018	M020	M021	M024	M025
A002	345-351	158-158	346-346	255-255	285-285	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	214-214	334-334	334-334	366-366	292-292
A003	345-351	158-158	343-343	237-237	288-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	307-334	307-307	357-357	301-301
A006	327-327	158-158	346-346	249-249	294-294	360-360	402-402	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	346-346	349-349	357-357	301-301
A010	345-351	158-158	346-346	240-249	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-307	357-357	292-292
A011	345-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-343	357-357	295-295
A013	345-351	158-158	346-346	234-255	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	334-334	340-340	366-366	292-292
A019	345-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	402-402	292-292	305-305	300-300	410-410	202-202	334-334	307-307	366-366	304-304
A022	351-363	158-158	346-346	237-237	261-261	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	416-416	214-214	307-340	307-307	357-357	307-307
A027	351-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	211-211	340-340	307-307	357-357	292-292
A030	351-351	148-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-307	366-366	298-298
B001	321-333	163-163	343-343	240-240	288-288	345-345	405-405	292-292	305-305	297-297	413-413	211-223	331-331	346-355	363-363	274-274
B005	333-333	163-163	343-343	240-252	288-294	345-366	402-405	292-298	299-305	297-303	413-413	214-220	331-340	343-346	363-366	256-256
B007	327-327	163-163	343-355	249-252	288-294	345-345	405-405	292-292	299-305	297-303	410-413	211-214	331-343	346-349	363-363	274-277
B008	333-351	158-163	343-343	240-246	288-294	345-345	405-405	298-298	305-305	297-303	410-413	211-211	331-343	352-352	360-366	274-283
B011	327-351	163-163	331-343	228-228	288-294	345-345	405-408	292-298	299-305	297-297	410-410	211-211	331-334	349-352	366-366	280-289
B015	327-351	158-163	343-343	228-237	288-294	345-345	405-405	298-298	299-305	297-303	410-413	211-211	331-334	346-352	357-360	256-256
B017	333-333	163-163	343-355	249-249	288-294	324-324	405-408	292-298	299-305	297-297	410-410	211-214	331-331	349-352	363-369	274-286
B019	351-351	158-158	343-343	246-249	288-294	360-366	405-408	298-298	305-305	300-300	410-413	211-217	334-337	349-349	360-366	274-283
B021	339-351	158-158	343-343	246-252	294-294	345-360	405-405	292-292	305-305	303-303	410-413	211-223	331-337	352-355	357-357	283-289
B026	351-351	158-158	343-343	234-246	294-294	345-366	405-405	280-292	305-305	300-300	410-410	211-211	337-337	343-358	357-357	256-292
U003	333-333	158-158	343-346	240-246	288-294	333-339	402-402	286-286	305-305	303-303	398-407	211-211	310-331	340-340	348-348	256-274
U006	339-345	158-163	337-337	234-234	288-288	339-348	399-405	286-286	299-305	303-303	410-413	211-211	310-310	337-337	348-348	235-256
U010	339-357	158-163	337-343	252-252	288-288	339-345	402-402	286-292	305-305	300-300	407-407	211-211	328-340	337-340	369-378	235-256

U012	327-345	158-163	343-349	225-234	288-294	339-348	402-402	286-292	299-305	300-300	410-410	211-214	310-337	334-346	348-348	235-256
U019	339-357	158-163	337-349	234-240	288-288	348-348	402-402	292-298	299-305	300-300	407-413	211-214	337-337	340-340	348-348	235-256
U020	327-327	158-158	343-349	234-234	288-294	345-345	402-402	292-292	305-305	300-300	407-407	211-214	310-310	358-358	348-372	256-256
U021	339-357	163-163	343-343	240-240	288-288	339-366	402-402	292-292	299-305	297-297	410-410	211-211	328-328	340-346	348-348	235-256
U024	339-339	163-163	337-343	243-246	294-294	345-345	402-402	286-298	299-305	303-303	410-410	211-211	310-310	343-343	348-384	235-286
U026	345-351	163-163	343-349	234-243	288-288	345-351	402-402	286-286	299-305	297-303	410-410	211-211	352-352	343-349	348-348	235-235
U030	333-333	163-163	343-343	252-252	288-288	348-348	399-405	292-292	299-308	303-303	413-416	220-220	328-331	343-349	363-363	256-256
CA001	327-345	158-183	343-352	240-249	294-294	345-354	405-408	289-298	305-305	300-300	416-416	211-211	334-334	343-349	354-369	289-289
CA002	333-351	158-158	340-352	249-255	294-294	348-360	405-405	289-298	305-314	300-300	419-419	223-223	334-334	343-355	354-369	277-277
CA004	333-333	158-158	349-349	243-243	294-294	354-366	408-408	298-298	305-314	300-300	413-416	211-211	334-337	337-352	366-369	283-289
CA008	327-339	158-183	340-355	243-249	294-294	348-360	405-405	289-298	305-314	300-300	410-416	211-211	337-337	337-343	354-366	286-286
CA011	345-345	158-183	352-358	231-240	285-294	333-348	405-408	298-298	305-305	300-300	410-416	205-205	334-334	340-340	354-354	280-280
CA014	333-345	163-183	343-352	231-240	294-294	348-348	405-405	298-298	305-305	297-300	407-413	220-220	337-337	349-352	354-372	268-286
CA020	333-333	163-183	343-352	234-240	294-294	351-354	408-408	298-304	305-314	300-300	419-419	205-220	337-343	343-349	354-363	286-286
CA022	327-339	158-183	343-352	240-249	294-294	345-348	405-405	301-301	305-305	300-300	413-413	211-220	337-337	-	369-369	280-289
CA025	339-339	158-183	355-355	240-249	288-294	345-354	399-408	298-304	305-305	300-300	410-413	214-223	334-337	-	360-366	289-298
CA027	339-345	163-183	352-352	240-240	288-294	348-360	399-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	328-337	343-343	360-369	274-292
H001	333-351	158-158	337-343	240-240	-	339-345	405-405	295-298	305-305	297-297	410-419	214-214	331-334	343-343	354-375	277-286
H002	333-351	158-163	337-343	234-237	288-288	345-345	402-402	298-298	302-305	345-345	419-422	211-214	331-337	340-346	372-372	256-280
H003	339-351	158-163	331-343	234-234	288-288	345-345	402-408	298-298	302-305	345-348	419-422	211-214	331-334	340-346	348-372	289-289
H005	351-351	158-163	331-349	240-243	288-288	345-345	402-408	298-298	302-305	345-345	419-419	208-214	334-337	340-346	372-372	256-256
H007	351-357	158-163	-	240-252	288-288	345-354	384-405	295-295	305-305	297-297	410-410	214-220	331-334	343-343	363-366	-
H008	333-339	158-158	343-343	243-243	252-288	345-354	408-408	298-298	305-305	294-297	425-425	202-202	334-340	349-349	366-372	256-256
H009	333-351	158-163	331-343	249-249	288-288	345-345	408-408	295-304	302-305	345-345	416-416	211-214	334-334	340-346	369-372	274-286
C047	339-345	158-163	349-349	246-246	291-291	345-351	405-405	301-301	305-305	300-300	413-413	214-220	343-343	346-346	363-369	283-289
C049	351-351	158-163	349-349	246-246	294-294	345-351	405-405	298-298	305-305	297-300	413-416	220-220	-	334-346	354-354	280-283
C052	327-351	163-163	349-349	246-246	291-297	345-351	405-405	301-301	308-308	297-300	413-416	211-220	307-307	340-343	354-360	283-289
C055	345-351	158-163	349-349	246-246	288-288	345-345	405-405	292-298	305-305	297-300	413-413	211-220	301-301	340-340	366-369	280-280

C056	351-357	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	-	340-340	366-366	283-283
C059	351-351	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	301-301	305-305	300-300	410-410	211-211	301-301	307-307	357-357	283-283
C062	357-357	158-158	343-343	246-246	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	301-301	307-340	357-357	274-274
C065	351-351	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	295-304	346-352	366-366	283-283
C067	351-357	163-163	355-355	240-240	285-294	345-345	405-405	298-298	305-314	297-300	416-422	211-211	328-343	343-343	360-372	286-289
C071	351-351	163-163	355-355	240-240	294-294	345-345	405-405	298-298	305-305	297-300	407-416	217-217	331-331	331-337	360-372	235-235
C075	351-351	163-163	349-355	249-249	294-294	345-345	405-405	298-298	305-305	297-303	413-416	220-220	307-307	331-349	360-372	286-286
I047	327-345	163-183	337-346	240-240	294-294	345-354	405-405	289-307	305-305	297-303	413-416	202-220	-	343-343	360-360	289-289
I050	327-345	158-163	337-355	240-246	294-294	345-366	405-408	298-298	305-305	297-303	413-416	208-220	-	334-343	369-369	289-292
I051	333-339	158-158	355-355	240-240	294-294	354-354	405-408	298-298	305-305	303-303	416-419	208-220	-	337-337	360-369	280-289
I053	339-339	158-163	337-355	240-240	294-294	354-366	405-405	298-298	305-305	300-303	413-416	208-208	-	340-343	360-369	280-289
I054	327-333	163-183	-	237-237	288-294	345-345	405-408	298-298	305-305	303-303	413-413	220-220	328-331	334-349	354-366	280-286
I056	327-327	163-183	343-346	237-237	294-294	345-354	408-408	298-298	305-305	300-300	401-413	211-220	301-301	343-349	354-366	280-280
I063	345-351	183-183	-	237-240	294-294	354-354	402-402	298-298	308-308	300-300	413-413	211-220	301-328	349-349	354-366	280-280
I065	339-345	158-163	-	240-249	288-294	360-360	384-405	298-298	305-305	300-300	413-419	211-220	334-334	385-385	354-360	271-292
I068	339-345	163-163	-	234-234	288-294	360-360	405-408	298-298	305-305	291-291	413-419	211-220	-	331-346	354-363	307-307
I071	339-345	158-163	-	249-270	-	-	405-405	298-298	305-305	303-303	416-416	-	-	346-346	354-354	292-292
I073	345-345	163-163	-	249-249	-	354-360	384-405	298-298	305-305	297-297	416-416	211-211	334-385	343-343	354-369	292-292
L001	327-345	163-163	343-346	234-237	288-294	339-339	405-405	292-298	305-305	300-300	413-416	211-214	307-331	349-349	360-363	232-232
L008	345-351	163-163	343-349	240-243	288-294	360-360	402-402	292-298	305-305	300-300	413-416	211-211	325-352	349-349	360-363	235-235
L010	345-345	163-163	343-349	234-246	294-294	360-366	402-402	286-292	305-305	291-291	416-416	211-214	325-328	343-343	360-363	235-256
L011	339-345	158-163	340-340	234-240	288-288	339-360	402-402	286-286	305-305	300-300	383-383	214-217	322-331	337-349	366-369	235-235
L015	345-351	158-158	346-349	240-240	294-294	339-366	405-405	286-292	305-305	300-300	410-413	214-217	322-331	343-343	366-369	235-235
L017	327-357	158-158	346-349	228-231	288-309	339-360	399-402	286-292	305-305	300-300	431-431	205-217	331-343	352-364	366-369	235-253
L020	321-357	158-158	346-349	228-234	288-288	339-360	399-402	286-292	305-305	300-300	383-383	205-214	334-352	343-349	366-375	253-274
L022	321-321	163-168	346-346	228-228	288-294	348-348	402-405	286-292	305-305	300-300	413-488	208-214	322-322	340-346	354-354	289-292
L026	333-345	158-163	346-349	237-246	288-288	348-360	402-402	286-286	305-305	300-300	413-488	211-214	322-325	343-343	348-354	235-256
L030	339-357	158-168	349-349	234-237	288-294	342-342	402-402	286-286	305-305	300-306	389-389	214-214	328-331	337-346	354-366	280-289

P044	351-351	163-163	343-343	243-243	288-294	345-345	405-405	292-298	305-305	297-297	413-416	220-220	298-340	346-358	351-351	280-280
P045	339-351	163-163	343-343	243-243	294-294	345-345	405-405	292-298	305-314	297-297	413-416	220-220	298-334	337-337	351-372	280-280
P046	351-351	163-163	343-343	249-249	288-288	345-345	405-405	298-298	305-305	297-297	413-413	220-220	298-325	358-358	351-351	283-283
P050	351-351	163-163	343-343	249-249	294-294	345-345	405-405	292-298	305-305	297-297	413-416	220-220	298-334	346-346	351-351	280-280
P051	369-369	158-158	352-352	240-249	288-288	354-354	408-408	298-298	305-305	300-300	416-416	211-211	304-334	337-352	354-354	289-289
P052	339-339	158-158	352-352	237-237	288-288	354-354	408-408	298-298	305-305	300-300	416-416	211-211	304-337	352-364	354-354	298-298
P055	375-375	158-158	352-352	249-249	288-288	354-354	408-408	298-298	305-305	300-300	416-416	211-211	304-337	343-355	354-354	302-302
P064	333-357	158-163	352-352	240-240	294-294	345-345	405-408	298-298	305-305	297-300	419-419	211-211	301-301	343-343	360-369	280-292
P066	351-369	163-163	343-352	243-249	288-294	345-354	408-408	298-298	305-305	297-297	413-419	205-211	-	343-343	360-360	266-286
P071	339-339	158-158	343-343	243-243	294-294	345-345	405-405	298-298	305-305	300-300	419-419	220-220	256-256	346-346	360-369	277-277
P073	333-357	163-163	340-355	240-243	294-294	345-354	405-405	298-298	305-305	297-297	419-419	211-214	289-289	343-346	369-369	277-280
T001	339-351	158-163	-	249-252	288-294	345-345	405-405	298-304	305-305	297-297	416-416	211-220	325-331	361-361	366-369	-
T003	321-333	153-158	337-337	237-240	279-279	345-345	405-405	298-304	305-305	297-300	410-416	220-220	298-325	343-346	360-378	256-256
T004	333-345	163-163	331-352	249-249	279-294	345-345	405-405	298-298	305-305	297-297	416-419	211-223	298-328	367-367	360-363	256-256
T006	351-351	158-163	343-352	240-252	279-294	345-354	405-405	286-295	305-305	297-300	410-419	220-220	298-325	-	360-366	235-289
T007	339-351	158-163	-	249-255	252-288	345-348	390-393	286-286	383-383	297-297	419-419	211-214	325-331	361-361	384-384	235-274
T009	345-345	163-163	-	252-252	288-288	345-351	384-405	292-292	305-305	297-300	413-416	220-220	334-340	385-421	366-372	286-286
T010	333-339	163-163	343-352	240-240	279-294	345-345	405-405	292-292	305-305	297-300	410-416	211-211	334-337	352-352	366-372	235-274
T011	345-351	163-163	331-352	234-237	279-294	345-345	405-405	286-292	305-305	297-300	416-419	211-211	298-328	352-352	366-372	289-295
T013	345-345	163-163	-	240-240	288-288	390-390	405-405	367-367	305-305	297-297	413-413	190-220	271-331	-	366-372	286-286
T015	351-351	163-163	343-343	237-240	288-294	345-345	405-405	292-292	305-305	297-297	410-413	211-220	298-328	352-352	357-360	256-274

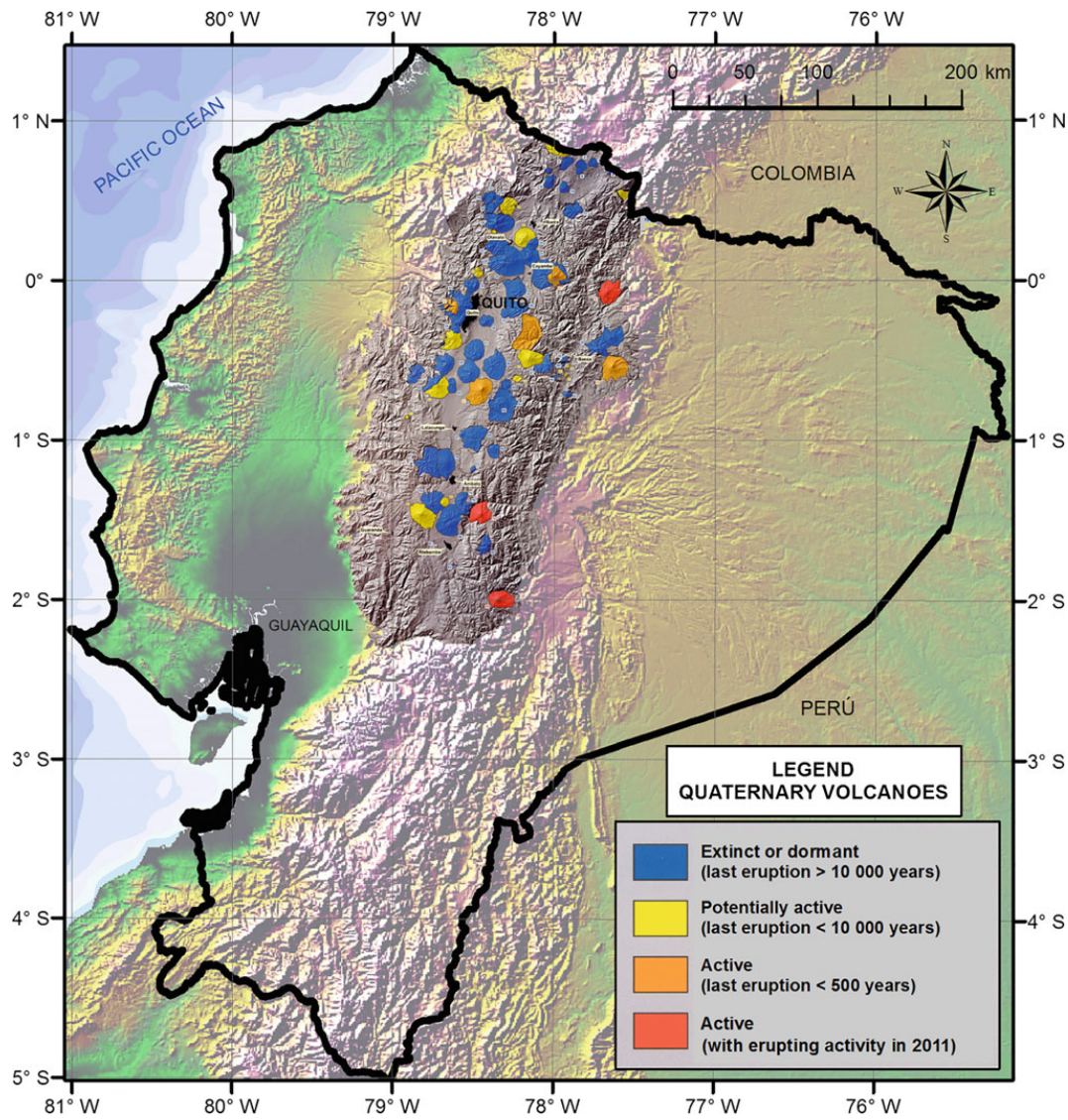
Anexo E. Cuantificación (ng/ul) del ADN extraído de los 100 individuos de mortiño analizados en este estudio.

Provincia	Localidad	Individuo	Concentración (ng/ul)
Carchi	El Ángel	CA001	426,3
		CA002	702,5
		CA004	397,8
		CA008	401,1
	San Gabriel	CA011	369
		CA014	491,9
		CA020	393,4
	La Cofradía	CA022	193,5
		CA025	505,1
		CA027	331
Imbabura	Cuicocha	I047	431,7
		I050	377,3
		I051	242,6
		I053	498,5
	Santa Lucía	I054	651,9
		I056	521,4
		I063	255,6
	Cahuasquí	I065	359,7
		I068	246,2
		I071	195,7
		I073	779,7
Pichincha	Mojanda	P064	449,6
		P066	644,5
		P071	439,9
		P073	375,5
	Cayambe	P051	640,1
		P052	574,7
		P055	446,9
	Lloa	P044	622,3
		P045	1065,4
		P046	856,5
		P050	700
Cotopaxi	Parque Nacional Cotopaxi	C047	572,7
		C049	482,4
		C052	599,8
		C055	786,6
	Quilotoa	C056	952,8
		C059	438,5
		C062	756,9
		C065	774,6

		C067	400	
	Sigchos	C071	587,8	
		C075	930,5	
		T001	741,9	
Tungurahua	Carihuairazo	T003	713	
		T004	1228,8	
		T006	861,8	
		T007	517,8	
		T009	626	
	Tisandeo	T010	426,5	
		T011	633,3	
		T013	206,3	
		T015	350,7	
		Cebapamba	B001	382,9
			B005	258,5
B007	210,3			
B008	115,8			
Bolívar	Salinas	B011	119,1	
		B015	274,5	
		B017	152,8	
	Salinas Norte	B019	316,6	
		B021	159,5	
Chimborazo	Quimiac	B026	123,9	
		H001	219,8	
		H002	320,6	
		H003	241,6	
		H005	164,1	
		H007	195,4	
		H008	313,7	
		H009	504,1	
		Cañar	Surimpalti	U021
U024	653,5			
U026	456,5			
U030	454,1			
Cerro Abuga	U012		480,3	
	U019		374	
	U020		830,1	
San Miguel	U003		579,7	
	U006		561,5	
	U010		615,3	
Azuay	Toreadora	A002	471,1	
		A003	380,1	
		A006	242,7	
		A010	615,2	
	Cajas	A011	540,3	
		A013	824	

		A019	537,2
		A022	711,2
	Cruces	A027	240,6
		A030	215,7
		L001	358,8
	Saraguro	L008	560,9
		L010	498,4
		L011	288,7
		L015	391,3
	Podocarpus	L017	327,6
		L020	347,3
		L022	297,9
		L026	294,5
	Santiago	L030	523,1

Anexo F. Zona de influencia de actividad volcánica antigua y reciente en Ecuador (Espinosa et al, 2018).



Anexo G. Genotipos de los 16 loci microsatélites de los individuos de *V. floribundum* de la región 4 (Quilotoa en Cotopaxi y Azuay). Los diferentes alelos están denotados según su tamaño en pb y separados por un guion (“-”).

	M001	M002	M004	M005	M007	M008	M009	M010	M011	M015	M016	M018	M020	M021	M024	M025
A002	345-351	158-158	346-346	255-255	285-285	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	214-214	334-334	334-334	366-366	292-292
A003	345-351	158-158	343-343	237-237	288-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	307-334	307-307	357-357	301-301
A006	327-327	158-158	346-346	249-249	294-294	360-360	402-402	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	346-346	349-349	357-357	301-301
A010	345-351	158-158	346-346	240-249	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-307	357-357	292-292
A011	345-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-343	357-357	295-295
A013	345-351	158-158	346-346	234-255	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	202-202	334-334	340-340	366-366	292-292
A019	345-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	402-402	292-292	305-305	300-300	410-410	202-202	334-334	307-307	366-366	304-304
A022	351-363	158-158	346-346	237-237	261-261	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	416-416	214-214	307-340	307-307	357-357	307-307
A027	351-351	158-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	211-211	340-340	307-307	357-357	292-292
A030	351-351	148-158	346-346	255-255	294-294	360-360	405-405	292-292	305-305	300-300	410-410	211-211	334-334	307-307	366-366	298-298
C056	351-357	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	-	340-340	366-366	283-283
C059	351-351	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	301-301	305-305	300-300	410-410	211-211	301-301	307-307	357-357	283-283
C062	357-357	158-158	343-343	246-246	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	301-301	307-340	357-357	274-274
C065	351-351	158-158	343-343	228-228	294-294	360-360	405-405	298-298	305-305	300-300	410-410	211-211	295-304	346-352	366-366	283-283