

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Uso de primers heterólogos para el análisis de posibles híbridos entre el guayabillo (*Psidium galapageium*) con la guayaba (*Psidium guajava*); en las islas Santa Cruz e Isabela, Galápagos, Ecuador.

Proyecto de investigación.

Ricardo Paúl Campoverde Iza

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de titulación presentado como requisito para la obtención del título de
Ingeniero 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**

Uso de primers heterólogos para el análisis de posibles híbridos entre el guayabillo (*Psidium galapageium*) con la guayaba (*Psidium guajava*); en las islas Santa Cruz e Isabela, Galápagos, Ecuador.

Ricardo Paúl Campoverde Iza

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico:

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico:

Gabriela Pozo Andrade, M.B.S.

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: Ricardo Paúl Campoverde Iza

Código: 00123889

Cédula de Identidad: 1718741828

Lugar y fecha: Quito, 23 de mayo de 2019

DEDICATORIA

En primer lugar, dedico este trabajo a mi padre y a mi madre: Fidel Campoverde y Norma Iza, quienes mediante su esfuerzo, incansable trabajo y amor, permitieron que estudie lo que me apasiona en la mejor universidad del Ecuador. Ustedes son mi vida entera.

Trabajar en este proyecto significó mucho para mí, ya que me llegué a conocer a mí mismo, mi potencial, mis aspiraciones, mis sueños, y lo que es realmente importante para mí. Me es grato haber recorrido este viaje con personas que tienen un lugar muy especial en mi corazón, por lo que este trabajo también se lo dedico a:

- Leticia Campoverde y Francisco Campoverde: hermana, hermano, los amo con todo mi corazón, son mi inspiración de cada día y lo más importante para mí.
- Alan Paz, Cristhian Ibarra, Josué Cruz y Sebastián Echeverría: son mis mejores amigos, estaré ahí siempre que me necesiten, gracias por tanto.
- Mishell Vaca: eres de las personas más especiales que conozco, gracias por tanta alegría, nunca dejes de brillar.
- Nathalia Valencia, Camilo Ramírez, Pedro Martínez, Sol Llerena y Camila Arboleda: son los mejores amigos de la carrera que pudo haber! Lo logramos Biotec Squad.
- Pamela Vega y Martín Terán: aunque nuestra amistad fue reciente, quiero que sepan que me han inspirado increíblemente, gracias por todo su apoyo, les deseo lo mejor.
- Camila Larco, que has estado pendiente de esta tesis y nuestra amistad a pesar de la distancia, te lo compensaré.

A todos aquellos que alguna vez perdieron la fe. Resistan. Sean fuertes y pacientes.

Las noches más oscuras hacen relucir a las estrellas más brillantes.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a María de Lourdes Torres por darme la oportunidad de trabajar en este proyecto, depositando su confianza en mí, y por todas sus enseñanzas que han sabido ir más allá del ámbito académico.

A Bernardo Gutiérrez y Diego Urquía, por su colaboración en el análisis de resultados, así como también por su apoyo y consejos durante todo este trabajo.

A Gabriela Pozo, María José Pozo, y Juan José Guadalupe, ya que siempre estuvieron pendientes de mi trabajo, me ayudaron a solucionar problemas, me brindaron consejos, y compartieron conmigo su optimismo y entusiasmo.

A Nina EDLM, Miguel Orellana, Gabriela Bruque, Sara Ponce, Andrea Argudo, Pamela Borja, Diana Mollocana, así como al resto del personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la USFQ, por haber compartido conmigo estos dos últimos años brindándome su amistad y también siendo una fuente de inspiración.

También agradezco al Galapagos Science Center (GSC), al facilitar sus instalaciones en las que se desarrolló una parte fundamental de este proyecto.

Agradezco de manera especial a Martín Terán, Pamela Vega, Nathalia Valencia, Sofia Donoso, Alison Reinoso y Daniela Rojas, quienes nunca dejaron que me rinda, al darme su apoyo, amistad y cariño cuando más lo necesitaba. Infinitas gracias. Les deseo lo mejor.

Finalmente, quiero agradecer a todas aquellas personas quienes, aunque no fueron parte del laboratorio, fueron pacientes conmigo y mi carácter, supieron escucharme y darme ánimos durante estos dos años. Ustedes saben quiénes son: hermana, hermano, amigas y amigos, los quiero mucho.

RESUMEN

Las Islas Galápagos son conocidas como un escenario modelo para estudios evolutivos, sobre todo por sus especies únicas en el mundo, siendo una de estas *Psidium galapageium*, conocido localmente como guayabillo, que se destaca por sus interacciones con la fauna local y por ser hospedadora de líquenes. Este ecosistema insular es afectado por la presencia de especies invasoras introducidas desde el continente, como lo es la guayaba, *Psidium guajava*, la cual ha sido identificada como altamente invasiva en estas islas. Se ha reportado que *P. guajava* ha llegado a crecer junto a árboles de *P. galapageium*, siendo posible la cruce entre ambas especies, la cual generaría híbridos. Estos híbridos presentarían una amenaza para la especie endémica en cuestión, por fenómenos como *genetic swamping*, reducción de la efectividad reproductiva de las especies, entre otros. El objetivo de este trabajo fue usar análisis basados en marcadores moleculares que permitan identificar individuos híbridos entre estas dos especies. Se utilizó marcadores moleculares microsatélites, específicos de *Psidium guajava*, para amplificar muestras de *Psidium galapageium* provenientes de diferentes localidades en las islas Santa Cruz e Isabela. También se amplificaron estas regiones para dos posibles individuos híbridos recolectados en Santa Cruz, nombrados como *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2*. Posteriormente, se determinaron los tamaños de alelos por electroforesis capilar, y al compararlos con los ya reportados para *P. guajava* en anteriores estudios, se identificaron alelos exclusivos y compartidos entre ambas especies. Se realizó un análisis de componentes principales (PCoA), en el que se distingue como los individuos forman dos agrupaciones distintivas, correspondientes a las dos especies. Entre estos dos grupos mencionados se encuentran ubicados los individuos *Psidium sp.1* y *Psidium sp. 2*. Por otro lado, utilizando el método bayesiano *Structure*, se obtuvo que el modelo óptimo para la estructura poblacional de los individuos analizados es el de dos grupos, los cuales nuevamente indican que *Psidium guajava* y *Psidium galapageium* se agrupan independientemente. En este análisis, se distingue que *Psidium sp. 1* presenta una mezcla de las dos especies, con una mayor contribución de *Psidium galapageium*. Se utilizó el software NewHybrids para determinar si los potenciales híbridos en realidad lo eran, obteniendo un valor de 15% para *Psidium sp. 1*. Los demás individuos analizados presentaron una probabilidad menor al 1% de pertenecer a un grupo híbrido. Además, se realizó un análisis de parentesco mediante el software Coancestry, que sugiere que tanto *Psidium sp. 1* como *Psidium sp. 2* están más emparentados entre sí, que con los demás individuos de *Psidium galapageium* y *Psidium guajava* analizados en esta investigación. Con los resultados obtenidos, no se puede afirmar ni descartar del todo la presencia de híbridos entre *Psidium guajava* y *Psidium galapageium*. Se requiere profundizar estos análisis para poder determinar o no la presencia de híbridos que podrían poner en peligro el bienestar de *Psidium galapageium* en las Islas Galápagos.

Palabras clave: *Psidium galapageium*, *Psidium guajava*, Islas Galápagos, hibridación, marcadores moleculares, microsatélites heterólogos.

ABSTRACT

The Galapagos Islands are a model scenario in evolutionary studies, having unique species that are not present anywhere else in the world. One of these is *Psidium galapageium*, locally known as Guayabillo, which has interactions with local fauna and is a lichens' host. The Galapagos have been perturbed by the presence of invasive species, most of them introduced from the continent, such as *Psidium guajava*, which has been identified as a highly invasive in these islands. It has been reported that, in some localities, *P. guajava* grows together with *P. galapageium* trees, so hybrids between these species could be present. These hybrids would represent a threat to the endemic species, by events like genetic swamping, reduction of reproductive effectiveness, and others. The objective of this study was to use molecular markers to identify hybrids between these two species. Specific microsatellite markers for *Psidium guajava*, were used to analyze *Psidium galapageium* samples, that were collected from different locations on the islands of Santa Cruz and Isabela. Also, two putative hybrids collected in Santa Cruz, named as *Psidium sp. 1* and *Psidium sp. 2* were analyzed. Subsequently, the sizes of alleles were determined by capillary electrophoresis and then, compared with those, reported for *P. guajava* in previous studies; identifying exclusive and shared alleles for both species. A principal component analysis (PCoA) was carried out, in which the analyzed individuals form two distinctive clusters, corresponding each one to one of the two species. The individuals *Psidium sp.1* and *Psidium sp. 2* were located between these two groups. Also, using the bayesian method Structure, it was determined that the optimal model for the population structure, is the one that considers two groups, showing again that *Psidium guajava* and *Psidium galapageium* group independently one from the other. In this analysis, it is remarkable that *Psidium sp. 1* shows admixture from the two species, having a principal contribution from *Psidium galapageium*. The NewHybrids software was used to determine if whether or not, the putative hybrids were real ones; obtaining a probability of 15% for *Psidium sp. 1* to belong to a hybrid group. All the other analyzed individuals held a probability of less than 1%. In addition, a relatedness analysis was performed using the Coancestry software, which suggests that both *Psidium sp. 1* and *Psidium sp. 2* are more related to each other than to the other individuals of *Psidium galapageium* and *Psidium guajava* analyzed in this study. With these results, it cannot be confirmed nor dismissed, the existence of hybrids between *Psidium guajava* and *Psidium galapageium*. It is required to perform a more profound analysis to determine if there are hybrids that can endanger the conservation and welfare of *Psidium galapageium* in the Galapagos.

Keywords: *Psidium galapageium*, *Psidium guajava*, Galapagos Islands, hybridization, molecular markers, heterologous microsatellites.

TABLA DE CONTENIDO

1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	12
1.1	Hibridación: Definición, sus causas y efectos en el ecosistema.....	12
1.2	Hibridación en islas y archipiélagos.....	14
1.3	El caso de las Islas Galápagos	15
1.4	<i>Psidium galapageium</i> , una especie nativa de las Islas Galápagos.	16
1.5	<i>Psidium guajava</i> , una especie invasora en las Islas Galápagos.	17
1.6	Marcadores moleculares microsátélites en estudios de hibridación.....	18
2.	<i>OBJETIVOS</i>	21
2.1	Objetivo general:.....	21
2.1.1	Objetivos específicos.....	21
3.	<i>JUSTIFICACIÓN</i>	22
4.	<i>ÁREA DE ESTUDIO</i>	23
5.	<i>MATERIALES</i>	24
5.1	Material Vegetal.....	24
5.2	Extracción de ADN.....	24
5.3	Cuantificación de ADN.....	25
5.4	Amplificación de regiones microsátélites por PCR	25
5.5	Electroforesis en gel de agarosa	26
5.6	Genotipado de productos de PCR.....	26
5.7	Análisis de datos.....	26

6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Recolección de muestras de <i>Psidium galapageium</i>	27
6.2 Extracción de ADN.....	28
6.3 Cuantificación de concentración de ADN e índices de pureza de extracción	29
6.4 Preparación de muestras para amplificación de microsatélites	29
6.5 Selección de primers específicos de <i>Psidium guajava</i> para amplificar regiones microsatélites en <i>Psidium galapageium</i>	29
6.6 Amplificación de regiones microsatélite por PCR.....	30
6.7 Electroforesis en gel de agarosa	31
6.8 Genotipado de producto de PCR para determinación de alelos.....	32
6.9 Análisis de datos.	32
7. RESULTADOS	34
7.1 Extracción de ADN de <i>Psidium galapageium</i> y cuantificación.	34
7.2 Amplificación con primers heterólogos y genotipado	35
7.3 Análisis de datos	35
7.3.1 Alelos compartidos y exclusivos entre <i>P. galapageium</i> , <i>P. guajava</i> y las 2 muestras <i>Psidium sp.</i> 35	
7.3.2 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	36
7.3.3 Análisis de hibridación mediante <i>Structure</i>	37
7.3.4 Asignación de individuos dentro de categorías híbridas mediante <i>NewHybrids</i>	38
7.3.5 Análisis de parentesco Coancestry	39
8. DISCUSIÓN.....	40
8.1 Regiones microsatélites mPgCIR para el estudio de <i>P. guajava</i> y <i>P. galapageium</i>	40

8.2	Grupos puros y posibles híbridos	42
8.3	Consideraciones en estudios de hibridación	45
9.	CONCLUSIONES	47
10.	RECOMENDACIONES	48
11.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
12.	TABLAS	54
	Tabla 1. Primers mPgCIR usados, secuencia, temperatura de annealing determinada, y número de alelos encontrados.....	54
	Tabla 2. Probabilidad de pertenencia de 22 (de las 272 en total) individuos a 6 diferentes grupos puros o híbridos.	55
	Tabla 3. Individuos con porcentaje mayor al 0.1% de pertenecer a grupos híbridos	57
	Tabla 4. Índices de Wang comparados entre <i>Psidium guajava</i> , <i>Psidium galapageium</i> , y las dos muestras a identificar	58
13.	FIGURAS	59
	Figura 1. Alelos compartidos entre <i>Psidium guajava</i> y <i>Psidium galapageium</i> , obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.	59
	Figura 2. Alelos compartidos entre <i>Psidium guajava</i> , <i>Psidium galapageium</i> , y <i>Psidium sp 1</i> , obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.	59
	Figura 3. Alelos compartidos entre <i>Psidium guajava</i> , <i>Psidium galapageium</i> , y <i>Psidium sp 2</i> , obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.	60
	Figura 4. Alelos compartidos entre <i>Psidium guajava</i> , <i>Psidium galapageium</i> , <i>Psidium sp 1</i> y <i>2</i> , obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite	60
	Figura 5. PCoA por individuo	61

Figura 6. Diagrama de estructura poblacional con K óptimo de 2.....	61
Figura 7. Diagrama de estructura poblacional con K de 3.....	62
1. ANEXOS	63
14.1 Anexo 1. Mapa de localidades en la Isla Santa Cruz, en donde se recolectaron individuos <i>Psidium galapageium</i>	63
14.2 Anexo 2. Mapa de localidades en la Isla Isabela, en donde se recolectaron individuos <i>Psidium galapageium</i>	63
14.3 Anexo 3. Coordenadas, concentraciones de ADN e índices de calidad para las 66 muestras extraídas en la isla Santa Cruz.....	64
14.4 Anexo 4. Coordenadas, concentraciones de ADN e índices de calidad para las 66 muestras extraídas en la isla Santa Cruz.....	66
14.5 Anexo 5. Matriz de alelos identificados en la región mPgCIR de individuos <i>P.galapageium</i> en las Islas Santa Cruz e Isabela.....	67
14.6 Anexo 6. Matriz de frecuencias alélicas para dos alelos en los diferentes grupos propuestos para el software NewHybrids.....	70
14.7 Anexo 7. Ejemplos de geles de electroforésis de producto de PCR con primers mPgCIR18 (arriba) y mPgCIR11 (abajo).....	70
14.8 Anexo 8 Ejemplos de electroferogramas obtenidos a partir del genotipado por electroforesis capilar en MacroGen Corea	71
14.9 Anexo 9 Árbol de <i>Psidium galapageium</i> (izquierda), creciendo junto a un árbol de <i>Psidium guajava</i> (derecha).	72
14.10 Anexo 10. Árboles de <i>Psidium galapageium</i> en la localidad Los Gemélos, en la isla Santa Cruz. 72	

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Hibridación: Definición, sus causas y efectos en el ecosistema.

Una especie se refiere a un grupo de organismos dentro del cual existe un entrecruzamiento de sus poblaciones naturales, estando aislado de manera reproductiva de otros grupos como este (Mayr, 1963). Dentro de la Biología, este concepto es mayormente aceptado, y es un referente para diferentes estudios de especiación y eventos de cruza. Uno de estos es la hibridación, la cual se define como el cruzamiento entre dos especies distintas (Daehler y Carino, 2001), o entre dos poblaciones genéticamente distintas (Arnold, 1997). Este fenómeno ha sido constatado en varias investigaciones, en donde la hibridación es el producto de dos especies de un mismo género (Stebbins, 1969; Arnold, 1992; Ellstrand et al., 2010).

La hibridación, al implicar el flujo de genes en especies relacionadas (Skulason y Smith 1995), puede tener ciertos efectos a nivel evolutivo, entre ellos: aumentar la diversidad genética intraespecífica, originar adaptaciones genéticas, originar nuevos ecotipos o especies y afectar a las barreras reproductivas (Rieseberg, 1997). Por otro lado, en ciertos escenarios, la hibridación también puede amenazar a las especies parentales del híbrido con la extinción (Levin et al, 1996; Vila et al., 2000; Daehler y Carino, 2001). Amplios estudios sobre esto se han dado en especies de peces como la lobina y la trucha en el suroeste de Estados Unidos, en donde se ha reportado que debido a la presencia de híbridos agresivos, se ha puesto en peligro a sus parentales, e incluso se ha dado la pérdida de taxones naturales (Edwards, 1979; Dowling y Childs 1992).

En especies vegetales, el producir semillas híbridas se da a expensas de obtener semillas de las especies parentales, de modo que se reduce la efectividad reproductiva de ambas especies parentales, incluso si estos productos híbridos no son viables o pasan a ser abortados (Levin, 1996). Más adelante, si es que estos híbridos son viables y tienen una adaptabilidad o *fitness* que promueva su estabilidad a través de las generaciones, pueden competir con sus parentales

por los recursos de su nicho, y además también compiten por su interacción con herbívoros, polinizadores, e incluso plagas (Levin, 1996).

Cabe recalcar que se ha reportado que incluso híbridos infértiles compiten por el espacio con sus especies parentales (Vila et al., 2000). Los efectos mencionados anteriormente se pueden catalogar como ecológicos, ya que estos afectan a especies nativas que no se limitan solo a sus parentales. Esto es común cuando se generan híbridos estables con una proliferación extensa, capaz de invadir hábitats y reemplazarlas (Vila et al., 2000).

La hibridación también causa efectos genéticos, ya que dicho entrecruzamiento entre dos especies origina nuevos genotipos que pueden o no brindar al híbrido la competitividad mencionada (Stebbins, 1969). Además de estos genotipos de adaptabilidad, se considera importante los que permitan a los híbridos estar reproductivamente aislados de sus parentales (Reisenberg, 1997), como por ejemplo los que generen alelos de incompatibilidad reproductiva (Levin, 1996). De cumplirse, esto puede promover a que los híbridos sean estables durante las siguientes generaciones, sean favorecidos por la selección, y que sus genotipos no se pierdan dentro del *pool* genético de sus parentales (Reisenberg, 1997).

Este último fenómeno tiene gran relevancia ya que, si los híbridos pueden formar cruza con sus parentales, se da una hibridación introgresiva (Vila et al., 2000). Esta, si bien puede generar nuevas adaptaciones para los parentales (Vila et al., 2000), es reconocida también por reducir la diversidad de las especies parentales, tanto en componentes de diversidad β (diferencia en la composición de especies entre localidades) y diversidad γ (riqueza total de especies en todas las localidades) (Seehausen et al, 2008).

Es así como varios autores sugieren que la hibridación es capaz de amenazar a especies nativas y sobre todo a especies consideradas raras o poco comunes, las cuales se presenten en poblaciones pequeñas (Daehler y Carino, 2001; Levin, 1996; Reisenberg, 1997).

En cuanto a estas últimas, Levin afirma que las especies insulares son particularmente vulnerables a la hibridación ya que suelen tener: números pequeños de individuos en sus poblaciones, mayor facilidad para la cruzarse con especies del mismo género, poca diferenciación en la arquitectura floral, polinizadores no especializados, y baja cantidad de semillas producidas (Levin, 1996).

1.2 Hibridación en islas y archipiélagos.

En los últimos cientos de años los seres humanos han generado un movimiento masivo de especies en todo el mundo, generando invasiones biológicas de especies exóticas. Estas especies colonizan ambientes y aumentan su número, provocando efectos ecológicos tales como la hibridación con especies taxonómicamente relacionadas (Vila et al, 2000). En el caso de las islas, se afirma que este fenómeno puede promover a que estas especies colonizadoras se establezcan a lo largo de sus generaciones en las islas, mientras que los híbridos resultantes pueden expandirse en nichos abiertos o no usados (Seehausen et al., 2008).

Dicha cruce entre especies se ha estudiado en varias islas, tal es el caso de la caracterización molecular de híbridos entre *Rubus hawaiiensis* y *R. rosifolius*, en la isla Maui en el archipiélago de Hawaii; siendo la primera una especie endémica de la isla y la segunda una introducida (Randel et al., 2004). En dicho estudio, se determinó eventos de hibridación asimétrica entre las dos especies, mencionando que no existía evidencia de retro-cruzas con los parentales (Randel et al., 2004). Así, al reconocer híbridos de primera generación entre estas dos especies, sugieren que se debe mantener un control de las especies *R. rosifolius* en la isla, así como de otras especies introducidas (Randel et al., 2004).

Otro estudio analizó posibles híbridos entre individuos del género *Psidium* en la Isla de Socorro en México (López-Caamal et al., 2013). Estas especies están separadas por diferencias altitudinales, siendo así que la endémica *P. socorrense* habita a altitudes mayores a los 800 m.s.n.m (metros sobre el nivel del mar), mientras que la introducida e invasora *P.*

sartorianum se encuentra entre 500 y 300 m.s.n.m. A pesar de las diferencias altitudinales, los resultados de dicho estudio, basados en marcadores moleculares RAPD y morfología de hojas, sugieren que existe una zona intermedia donde ocurre flujo génico entre las dos especies, esta se encuentra entre los 400 y 700 m.s.n.m.

Según los resultados, los individuos de esa zona intermedia, fueron asignados como híbridos entre las dos especies (López-Caamal et al., 2013). Sugieren también que las barreras reproductivas entre las dos especies, fueron afectadas por la presencia de rebaños de ovejas la cual causó erosión y otros impactos en el ecosistema en cuestión. Además, los autores indican haber encontrado indicios de hibridación introgresiva entre los híbridos y la especie endémica *Psidium socorrense*, lo cual puede afectar a la conservación de esta.

1.3 El caso de las Islas Galápagos

Las Islas Galápagos se originaron a partir de erupciones volcánicas en el Océano Pacífico, que formaron un archipiélago de 14 islas y otros islotes, a aproximadamente 960 km de Ecuador (Jackson, 1993). Es así como estas son un escenario modelo para el estudio de especies invasoras (Schultz, 2003; Hamann, 2001); ya que sus especies endémicas no han tenido contacto con masas terrestres continentales, siendo este un ecosistema aislado. En este, se asume que las especies que colonizaron tempranamente las islas, llenaron los nichos ecológicos no ocupados, y evolucionaron de manera independiente de especies relacionadas en el continente (Dal Forno et al., 2017).

En estas islas, las especies vegetales nativas han sido afectadas por eventos naturales como erupciones volcánicas, incendios, el fenómeno de El Niño, entre otros; y así también por diversos eventos antropogénicos como introducción de especies, incendios, fragmentación de hábitat y explotación de recursos (Hamann, 2001). Estos fenómenos tienen aún un mayor impacto en especies nativas consideradas como raras o poco comunes, las cuales representarían alrededor de un 24% de la flora total nativa de estas islas (Adersen, 1989). Dentro de estas, se

encuentra *Psidium galapageium*, la cual se ha visto amenazada por eventos de sequía, tala agrícola, tala maderera, el fenómeno de El Niño, erosión, entre otros (Adsersen, 1989; Dal Forno et al., 2017).

A parte de estas amenazas, *Psidium galapageium* es amenazado por la presencia de *Psidium guajava* en su ecosistema, ya que al pertenecer al mismo género *Psidium*, existe la posibilidad de que produzcan híbridos que tendrían el potencial de afectar a la conservación de esta especie endémica (Torres y Gutiérrez, 2018). Esta hipótesis surge al evidenciar que, en las Islas Santa Cruz, Isabela, y San Cristóbal, existen espacios geográficos en los que *Psidium guajava* y *Psidium galapageium* co-existen (Aldaz y Tye, 1999; Valdebenito, 2018).

1.4 *Psidium galapageium*, una especie nativa de las Islas Galápagos.

Psidium galapageium Hook.f., conocido localmente como guayabillo, es una especie endémica de las Islas Galápagos, la cual pertenece a la familia *Myrtaceae* y se ha reportado distribuida en islas Santa Cruz, Isabela, San Cristóbal, Fernandina y Santiago; generalmente en las llanuras áridas y las áreas altas húmedas (McMullen, 1999). En la isla Santa Cruz, se lo conoce ampliamente por ser un árbol típico en el bosque de transición de *Scalesia* junto a los árboles de este género y también junto a otros de *Pisonia floribunda* (Itow, 1992), (Bungartz et al., 2013), (Schofield, 1989).

En cuanto a la morfología de esta especie, es un arbusto o árbol pequeño que puede llegar hasta los 8 metros de alto, sus hojas son opuestas simples elípticas, llegando incluso a ser ovaladas, las cuales tienen un rango de 1,8 a 5,5 centímetros. En cuanto a sus flores, su tamaño puede llegar a los 1,5 cm, son solitarias, axilares, con una corola blanca y cinco pétalos de 0.4 a 0.9 cm; con numerosos estambres y filamentos blancos. El fruto de *P. galapageium* se caracteriza por ser una baya de 0.6 hasta 1.3 cm, con colores que van desde el amarillo hasta el café rojizo a negro después de su maduración y con numerosas semillas (McMullen, 1999).

Psidium galapageium presenta dos variedades, *P. galapageium* var. *howelii* y *P. galapageium* var. *galapageium*; siendo la primera más común en San Cristóbal y Santa Cruz; mientras que la segunda se encuentra en las islas Fernandina, Isabela, Pinta, Santiago y también Santa Cruz (McMullen, 1999). Tomando en cuenta que la morfología anteriormente descrita corresponde a *P. galapageium* var. *galapageium*; las diferencias entre estas dos variedades son que, la variedad *howelii* presenta un tamaño que va desde los 2 hasta los 6 metros de altura, sus yemas tienen 5 lóbulos apicales, abiertos a la antesis, son tomentosas, y con un cáliz que se abre irregularmente en 4 lóbulos desiguales (Porter, 1968).

Se ha reportado que, por su madera, esta especie ha sido explotada por los habitantes de estas islas para usarla en edificaciones y embarcaciones; siendo incluso alguna vez exportada a Guayaquil (Wiggins et al., 1971). Actualmente se promueve su conservación ya que varios estudios han resaltado la importancia ecológica de *P. galapageium* por sus interacciones con la fauna local y por ser hospedador de varios líquenes (Cimadom et al., 2016; Traveset et al., 2016; Schultz, 2003; Dal Forno et al., 2017).

1.5 *Psidium guajava*, una especie invasora en las Islas Galápagos.

Psidium guajava L., también pertenece a la familia *Myrtaceae*, es un árbol pequeño de hasta 8 metros de alto, conocida como guayaba o guava en inglés. Sus ramas presentan cuatro ángulos, son tomentosas y con tricomas blancos o grises (McMullen, 1999). Sus hojas son opuestas, con un tamaño de 5 a 14 cm de largo y de 2 a 6 cm de ancho y van desde ovaladas a lanceoladas; además, estas también son venosas en la superficie, con márgenes enteros, tomentosas y con un ápice obtuso a redondeado. Sus flores son axilares y se pueden presentar solitarias o en grupos de 2 a 3, con una corola blanca, 5 pétalos que van desde el 1 hasta 2 cm de largo (Wiggins et al., 1971).

Los frutos de *P. guajava* se caracterizan por ser una baya globosa, de un amarillo pálido, de textura glabra y rugosa; alcanzan de hasta 5 cm de diámetro en su madurez, con una pulpa

de color rosa que contiene numerosas semillas (Wiggins et al., 1971; Porter, 1968). Estos frutos tienen un aroma característico, sabor agridulce, y tienen un gran contenido de vitamina A, vitamina C, niacina y riboflavina. Esto ha contribuido a que sea una especie importante comercial y nutricionalmente (Soares et al., 2007). Es así como *P. guajava*, a pesar de ser un árbol nativo de la América tropical, su cultivo se ha expandido a demás regiones tropicales y subtropicales del mundo tales como Brasil, Asia, Sudáfrica, y Egipto; llegando a estar presente en más de 60 países (Nishimura et al., 1989).

En el caso de las Islas Galápagos, *P. guajava*, se sugiere que fue introducida en las Islas Galápagos desde el continente, posiblemente por sus primeros colonizadores en 1850 (Walsh et al., 2008), para su alimentación y la de su ganado (McMullen, 1999). Especies nativas como aves y tortugas consumen sus frutos y dispersan en sus heces numerosas y pequeñas semillas (Schultz, 2003; Guerrero y Tye, 2009). Esto ha promovido el escape de su estado de cultivo y que se vuelva común en los bosques de las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Floreana e Isabela (Porter, 1968). A esto se le suma que es una especie que se reproduce sexual y asexualmente, con ciclos de reproducción cortos, y que no requiere de condiciones especiales de suelo o luz para crecer; estos son caracteres de una especie altamente invasiva (Heywood y Jackson, 2012; Somarriba, 1986). El control de esta especie invasora es una prioridad en las islas dado que, además de competir con las especies nativas, genera cambios en el ecosistema como menos paso de luz y modificación estructural del suelo (Jäger et al., 2009).

1.6 Marcadores moleculares microsatélites en estudios de hibridación.

Existen estudios que mediante el uso de datos fenotípicos como morfología o fisiología, estudian posibles organismos híbridos, y las relaciones entre ellos y sus parentales (Buren et al., 1974; Lambert y Johnson 1978; Cardi et al., 1993). Sin embargo, en las últimas décadas, el desarrollo de distintas técnicas y metodologías de la biología molecular han permitido asociar un fragmento de ADN con una posición en el cromosoma, estableciendo marcadores

moleculares (Henry, 2001). Estos proveen información directa o indirecta de la secuencia de ácidos nucleicos, lo cual permite que estos estudios se realicen usando sistemática molecular (Avice y Ferguson, 1995).

Uno de estos marcadores son los microsátélites, los cuales son secuencias nucleotídicas simples repetidas (SSRs) en tandem, que generalmente presentan motivos desde 1 a 6 pares de bases (Horst y Wenzel, 2007). Estas repeticiones, usualmente son causadas por un deslizamiento de la hebra replicada y existen errores por apareamiento de las bases (Tomar, 2010). De esta forma, se generan menos, o aún más repeticiones de los motivos presentes en estas regiones, de modo que el número de estas puede ser variable entre individuos (Spooner, 2005); develando polimorfismos que permiten identificar variedades dentro de especies, analizar el germoplasma, y establecer relaciones genéticas entre organismos o entre poblaciones de estos (Horst y Wenzel, 2007).

De conocerse la secuencia de nucleótidos que flanquean estas regiones microsátélites se pueden diseñar primers específicos para amplificarlas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Horst y Wenzel, 2007). Esta utiliza ciclos de temperatura, por los cuales una muestra de ADN se desnaturaliza a 94° C para separar la doble cadena, generando hebras molde. Luego se enfría a una temperatura específica para permitir la unión de los primers, y vuelve a aumentar la temperatura a 72° C para que la polimerasa sintetice una hebra complementaria a la molde, generando un número de copias de la secuencia del microsátélite, el cual será exponencial al repetir estos ciclos varias veces (Tomar, 2010).

Este proceso hace que la cantidad de ADN sea suficiente para identificar los tamaños de estos fragmentos, de forma visible en geles de agarosa o poliacrilamida (Tomar, 2010). La electroforesis capilar es otra forma de genotipado, en la cual se emplea una PCR en la que interviene un tercer primer que tiene anclado un fluoróforo, de modo que este es incorporado al momento de amplificar el fragmento de ADN (Heller y Altria, 1997). Así, el amplicón es

excitado por un laser y consecuentemente emite una luz de cierta intensidad, que es detectada y traducida a una señal eléctrica, la cual genera picos en un electroferograma. En este, usando tamaños de referencia, se indica el tamaño en pares de bases de dicho fragmento amplificado (Butler, 2005).

Usando estas técnicas se puede identificar el tamaño de los amplicones obtenidos de determinada muestra, los cuales al variar en su tamaño de pares de bases, indicarían la variación de repeticiones en tándem en el microsatélite (Horst y Wenzel, 2007). De esta forma se puede determinar cuáles son los alelos para estas regiones, que pueden ser polimórficas al presentar varios alelos (Henry, 2001). Además de esta ventaja, los microsatélites también son abundantes a lo largo del genoma y son codominantes. Esto último permite diferenciar si un alelo es homo o heterocigoto (Kaundun y Matsumoto, 2002).

Otra característica de estos marcadores moleculares es que las regiones que flanquean a los microsatélites suelen ser relativamente conservadas en taxones relacionados, permitiendo así que los primers diseñados específicamente para una especie, se puedan usar también en una especie emparentada, o cercana evolutivamente a esta (Westman y Kresovich 1998). A estos primers se los conoce como heterólogos (Spooner, 2005). De este modo, al realizar estudios de hibridación, se puede amplificar las mismas regiones microsatélites tanto en individuos parentales como híbridos. Con esta información alélica, se procede a realizar un perfil genético de los individuos intermedios, estudiar el estado de estos, como se relacionan con las parentales, el estado de su diversidad genética, entre otras (Pollegioni et al., 2004; Schrey et al., 2007; Pisanu et al., 2011).

En el presente estudio se utilizaron 10 pares de primers específicos para *Psidium guajava* para amplificar regiones microsatélite de *Psidium galapageium*, con el fin de identificar individuos híbridos entre las dos especies, en las islas Santa Cruz e Isabela.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general:

- Identificar posibles eventos de hibridación entre *P. galapageium* y *P. guajava*; en las islas Santa Cruz e Isabela, Galápagos, mediante el análisis de regiones microsatélite.

2.1.1 Objetivos específicos

- Usar primers heterólogos, específicos para *Psidium guajava*, para amplificar y analizar regiones microsatélite en *Psidium galapageium*.
- Comparar los alelos obtenidos con los identificados en individuos *P. guajava* en las islas Santa Cruz e Isabela
- Analizar los posibles eventos de hibridación entre *Psidium galapageium*, y *Psidium guajava* en las islas Santa Cruz e Isabela mediante el uso de softwares que emplean estadística bayesiana.
- Determinar si dos muestras catalogadas como híbridos potenciales, son en realidad híbridos o pertenecen a *Psidium galapageium* o *Psidium guajava*.

3. JUSTIFICACIÓN

En las Islas Galápagos, de 168 especies endémicas vegetales evaluadas, el 60% están amenazadas (Tye, 2006). En el caso de *Psidium galapageium*, esta especie tiene un estado de vulnerable; el cual se estableció tanto en reportes del 2002 como del 2006 (Tye, 2006).

El hecho de que *P. galapageium* esté en esta categoría es preocupante también para la conservación de otras especies con las que interactúa. Por ejemplo, existen líquenes que viven sobre la superficie del guayabillo, como *Ramalina usena*, *Dictyonema pectinatum*, *Collema furfuraceum*; estas dos últimas son endémicas de las Islas Galápagos (Bungartz, 2008; Aptroot y Bungartz, 2007; Dal Forno et al., 2017). Además, existen varios estudios demuestran que *P. galapageium* es consumida por animales de las islas como diferentes especies de tortugas e iguanas terrestres. Esto se constató al encontrar sus semillas en las heces de estos animales (Schultz, 2003; Traveset et al., 2016; Puga et al., 2017).

No se encontraron reportes en la bibliografía sobre aves de estas islas que consuman esta especie, aunque se menciona que sus frutos les son potencialmente atractivos (Guerrero y Tye, 2009). Sin embargo, se ha descrito una importante relación entre cuatro especies de pinzones con las hojas de *P. galapageium*. Estos frotran las hojas de esta especie endémica en sus alas, lo cual se demostró que repele a la mosca hematófaga *Philornis downsi*, tanto en su estado adulto como larval (Cimadom et al., 2016). Esto encamina a futuros estudios sobre compuestos químicos de interés obtenidos de *P. galapageium*, recalcando que ya se la había estudiado por ser una posible fuente de cianógenos (Adsersen et al., 1988).

Tanto fenómenos naturales como antropogénicos amenazan a *P. galapageium*, entre ellos la introducción y la dispersión de la invasiva *P. guajava*, provocando que estas compartan nichos (Aldaz y Tye, 1999). Así, existe la posibilidad de eventos de hibridación entre estas (Torres y Gutiérrez, 2018); que, como se mencionó, generarían efectos negativos para *P. galapageium* y su ecosistema.

4. ÁREA DE ESTUDIO

Este proyecto abarca las islas Santa Cruz e Isabela en el archipiélago de Galápagos, en las cuales existen individuos de *Psidium galapageium* y *Psidium guajava*. En salidas de campo realizadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, se recolectaron muestras de *P. galapageium* y *P. guajava* en varias localidades en estas islas. Para este estudio en particular, se seleccionaron localidades donde cohabitan las dos especies.

En la isla Santa Cruz, hubo 16 localidades, nombradas: Bellavista, Camote, Cascajo, Caseta, Chato, Centro Mesa, Elías Cando, Garrapatero, Granillo Rojo, Los Gemelos, Los Guayabillos, Manzanillo, Occidente, Pájaro Brujo, Salasaca y Tomás de Berlanga. Mientras. En la isla Isabela, las localidades fueron las siguientes 6: Barrio Loja, Cerro Grande, El Mango, Finca Morocho, Finca Ricardo García y San Joaquín. Se planteó usar 5 muestras de *P. galapageium* de cada una de estas localidades, siendo cada muestra un individuo diferente. Sin embargo, para Centro Mesa, Caseta, Elías Cando, Pájaro Brujo y Barrio Loja, se usaron de 1 a 3 según la disponibilidad de estas. De este modo se seleccionaron en total 67 individuos de la isla Santa Cruz y 27 de la isla Isabela.

Estas muestras se conservaron en congelación en el Laboratorio de Biología Molecular de la estación de investigación Galápagos Science Center (GSC), que se encuentra en la isla San Cristóbal. Fue así como en la estación, se realizó la extracción de ADN de las hojas y también su cuantificación; posteriormente se trasladaron estas extracciones al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Allí se llevó a cabo la amplificación de microsatélites mediante PCR, los respectivos geles de electroforesis, y los amplicones obtenidos fueron enviados a Macrogen en Corea para que se ejecute la electroforesis capilar.

5. MATERIALES

5.1 Material Vegetal

- Hojas de 67 individuos *Psidium galapageium* recolectados en 16 localidades de la Isla

Santa Cruz (Anexo 1)

Bellavista:	5 muestras
Camote:	5 muestras
Casajo:	5 muestras
Caseta:	1 muestra
Chato:	5 muestras
Centro Mesa:	3 muestras
Elías Cando:	2 muestras
Garrapatero:	5 muestras
Granillo Rojo:	5 muestras
Los Gemelos:	5 muestras
Los Guayabillos:	5 muestras
Manzanillo:	5 muestras
Occidente:	5 muestras
Pájaro Brujo:	1 muestra
Salasaca:	5 muestras
Tomás de Berlanga:	5 muestras

- Hojas de 27 individuos *Psidium galapageium* recolectados en 6 localidades de la Isla

Isabela (Anexo 2)

Barrio Loja:	2 muestras
Cerro Grande:	5 muestras
El Mango:	5 muestras
Finca Morocho:	5 muestras
Finca Ricardo García:	5 muestras
San Joaquín:	5 muestras

5.2 Extracción de ADN

- Hojas de 94 individuos *Psidium galapageium*, tanto de Santa Cruz como de Isabela
- Balanza analítica OHAUS (Pioneer™)
- Mortero y pistilo
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)

- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN)
- Tubos Eppendorf 1.5 mL
- Pipetas de 1-10, 20-200, 100-1000 µL
- Puntas plásticas para pipetas de 1-10, 20-200, 100-1000 µL

5.3 Cuantificación de ADN

- ADN extraído de *Psidium galapageium*
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Buffer AE for elution (QIAGEN)
- NANODROP 1000 (Thermo Scientific)
- Pipetas de 1-10 µL
- Puntas plásticas para pipetas de 1-10 µL

5.4 Amplificación de regiones microsatélites por PCR

- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- BSA (Thermo Fisher Scientific)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- dNTPs 10 mM (Invitrogen)
- 10 pares de primers heterólogos (Kanupriya et al., 2011), Tabla 1.
 - 10 primers forward modificados con la cola universal 5'GCCTCCCTCGCGCCA-3' (Blackett, et al., 2012)
 - 10 primers reverse
- Oligonucleótidos 3'-CGGAGGGAGCGCGGT-5', complementarios a la cola universal, marcados con los fluoróforos VIC, 6FAM, NED o PET.

- Taq platinum ADN polimerasa 5U/ μ L (Invitrogen)
- ADN de *Psidium galapageium* en concentración de 20 ng/ μ L
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf).
- T Personal Thermocycler (Biometra)
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Pipetas de 1-10, 20-200, 100-1000 μ L
- Puntas plásticas para pipetas de 1-10, 20-200, 100-1000 μ L

5.5 Electroforesis en gel de agarosa

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

5.6 Genotipado de productos de PCR

- Placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems ®)
- 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems ®)
- Software GeneMarker ® (SoftGenetics LLC, 2012)

5.7 Análisis de datos

- Software R-studio (RStudio Team, 2015), incluyendo:
 - Paquete adegenet (Jombart, et al., 2016)
 - Paquete ape (Paradis, et al., 2018a)

- Paquete pegas (Paradis, et al., 2018b)
- Paquete ade4 (Dray, et al., 2018)
- Paquete diveRsity (Keenan, 2018)
- Paquete hierfstat (Goudet y Jombart, 2018)
- Paquete ggplot2 (Whickham y Chang, 2018)
- Software STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard, et al., 2004)
- Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2014)
- Software NewHybrids (Anderson y Thompson, 2002).
- Software Coancestry (Wang, 2011)
- Microsoft Excel ®

6. METODOLOGÍA

6.1 Recolección de muestras de *Psidium galapageium*

En mayo del 2015 y julio del 2016, personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, realizó salidas de campo a las islas Santa Cruz e Isabela respectivamente. Durante estas se recolectaron entre 3 a 5 individuos de *P. galapageium* y *P. guajava* a lo largo de localidades establecidas para estudios de diversidad genética de estas especies (Urquía, 2018; Soria, 2018; Espín, 2018; Cazco, 2018).

De cada uno de estos individuos se recolectaron de 2 a 5 hojas, y se tomaron las coordenadas de estos usando un GPS (Anexo 3 y Anexo 4). Este material vegetal fue respectivamente almacenado en fundas plásticas, así como rotulado. Se los mantuvo en congelación a -20° C en el Laboratorio de Biología Molecular de la estación de investigación Galápagos Science Center (GSC), ubicada en la Isla San Cristóbal.

Las siguientes etapas de la Metodología descritas a continuación: Extracción y cuantificación de ADN, Amplificación de las regiones microsátelite, y Genotipado; se refieren

a los 94 individuos *P. galapageium* mencionados en la sección Área de Estudio. Para la selección de estos, se eligieron individuos de localidades en las que se recolectaron tanto individuos de *P. galapageium* como de *P. guajava* en las islas Santa Cruz e Isabela.

6.2 Extracción de ADN.

La extracción de ADN de los 94 individuos mencionados, se ejecutó siguiendo el protocolo del kit de extracción DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN). Así como este requiere, para cada individuo, se pesó 60 mg de hojas en la balanza analítica; y este material vegetal se lo trituró usando el mortero y pistilo. Una vez triturado el material, se lo colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL, dentro de los cuales se añadió 400 µL del Buffer AP1 y 4 µL del RNase A, provistos por el kit. A esta mezcla, se le dio un vortex y posteriormente, se la incubó en la cámara de arena a 65° C por 10 minutos. Durante este tiempo de incubación, se invirtieron los tubos, mezclando su contenido, cada 3 minutos.

A continuación, se colocó 130 µL del Buffer P3, se mezcló vigorosamente y se incubó en hielo por 5 minutos, y una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó por 5 minutos a 14 000 rpm. El lisado obtenido de este proceso, se lo pasó a una columna QIAshredder spin; y una vez en esta, se centrifugó por 2 minutos a 14 000 rpm. Después, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, sin topar, ni tomar el pellet con la pipeta. En este se agregó, 700 µL del Buffer AW1 y se lo resuspendió con la pipeta.

Una vez realizado este procedimiento, se transfirió alícuotas de 650 µL esta mezcla a la columna DNeasy Mini spin, la cual se encontraba acoplada a un tubo de recolección de 2 mL. A esta, se la centrifugó por un minuto a 8000 rpm y se descartó el sobrenadante. Esto se repitió con el resto de alícuotas por cada muestra. A continuación, se colocó esta columna en un nuevo tubo de recolección, se añadió 500 µL de Buffer AW2 y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto. Siguiendo a esto, se descartó el sobrenadante, se añadieron otros 500 µL de Buffer AW2 y ahora se centrifugó por 2 minutos a 14 000 rpm.

Posteriormente, se transfirió la columna DNeasy Mini spin, a un nuevo tubo Eppendorf de 1.5 mL, se añadió 100 µL de Buffer AE for elution, se reposó por 5 minutos, y se centrifugó por 1 minuto a 8000 rpm. Se repitió este último paso una vez, pero usando solo 50 µL de Buffer AE for elution, ya que se esperaba recuperar menos ADN de la columna. De este modo, se obtuvo dos tubos Eppendorf de extracción por individuo, contenidos en 100 y 50 µL del buffer de elución del kit.

6.3 Cuantificación de concentración de ADN e índices de pureza de extracción

Se usó el espectrofotómetro NANODROP 1000 (Thermo Scientific) para determinar la concentración y calidad para cada una de las extracciones obtenidas de las muestras. Para esto se usó como blanco el buffer de elución del kit mencionado anteriormente, ya que en este se encuentran diluidas las extracciones. Además, al cuantificar este parámetro, también se obtuvo la calidad de ADN, reflejada en los índices 260/280 y 260/230 nm, que son un indicador de contaminación por proteínas o fenoles respectivamente.

6.4 Preparación de muestras para amplificación de microsatélites

Con los datos obtenidos de concentración de ADN, se procedió a diluir las muestras de ADN a una concentración de 20 ng/µL. Para esto se utilizó como solvente agua ultra pura, la misma que se usa para la reacción de PCR. Vale mencionar que también se obtuvo muestras con concentraciones menores a 20 ng/µL. Para trabajar con estas, se procedió a realizar alícuotas de 25 µL directamente desde el tubo de extracción, es decir sin diluir, y al momento de realizar la reacción de PCR, se tomó 2 µL de esta alícuota.

6.5 Selección de primers específicos de *Psidium guajava* para amplificar regiones microsatélites en *Psidium galapageium*

Para este estudio se usaron primers mPgCIR específicos para *Psidium guajava*, los cuales fueron descritos por Kanupryia et al. (2011). Estos mismos fueron usados por estudios previos de diversidad genética de *P. guajava* en las islas San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela,

(Ponce 2014; Urquía, 2018; Espín, 2018) y un estudio sobre eventos de hibridación con *P. galapageium* en la Isla San Cristóbal (Ponce, 2016).

Para seleccionar estos primers SSR heterólogos se tomaron en cuenta dos criterios: Primero, se escogieron a los pares de primers que demostraron ser polimórficos en estudios de diversidad genética de *P. guajava* en la isla Santa Cruz (Urquía, 2018) mencionados previamente. Segundo, de estos primers polimórficos, se escogió aquellos que también fueron usados en el estudio de hibridación de San Cristóbal (Ponce, 2016). De este modo, se eligieron 10 pares de primers SSR, descritos en la Tabla 1.

Es preciso aclarar que todos los primers forward mencionados en esta sección, tienen una modificación en la secuencia descrita por Kanupryia et al. (2011). A esta se le aumentó una secuencia referida como *cola universal*, la cual tiene complementariedad con la secuencia de los oligonucleótidos marcados con fluoróforos. La unión de estas, permitieron llevar a cabo el genotipado siguiendo la metodología de Blacket et al. (2012).

6.6 Amplificación de regiones microsatélite por PCR

En cuanto a las reacciones en cadena de la polimerasa PCR ejecutadas en este estudio, en un inicio se llevaron a cabo siguiendo las mismas concentraciones y programa de ciclado usado en el ya mencionado, proyecto de diversidad genética de *P. guajava* en la isla Santa Cruz (Urquía, 2018). La razón fue que en ese proyecto se usaron los mismos primers mPgCIR, pero estos ya incluían la *cola universal* mencionada anteriormente. Por el contrario, el protocolo empleado por Ponce (2016) quien amplificó *P. galapageium* con estos mismos primers heterólogos, no tenían dicha modificación de estas secuencias, por lo cual no se lo utilizó.

Como volumen final por reacción de PCR, se establecieron 30 μ L, tal como lo hicieron otros proyectos que usaron electroforesis capilar para el genotipado (Soria, 2018; Espín, 2018; Cazco, 2018). La razón fue que este volumen era el suficiente para realizar la electroforesis en gel de agarosa, y también para tener al menos dos alícuotas para enviar al genotipado por

electroforesis capilar. Algo que también se adaptó al protocolo fue el uso de suero de albúmina bovina BSA, ya que se ha reportado que previene la acción de inhibidores de la actividad de la polimerasa (Butler, 2005); los cuales se presume que existen en la especie *P. galapageium*.

Así, el protocolo general de PCR para un volumen de 30 μL por reacción, mantuvo las siguientes concentraciones de reactivos: 1X de BSA, 1X de Buffer de PCR, 2.5 mM de MgCl_2 , 0.2 μM de dNTPs, 0.15 mM de primer forward, 0.5 mM de primer reverse y 0.5 mM de oligonucleótidos complementarios a la cola universal marcados con uno los fluoróforos VIC, 6FAM, NED o PET; 1 U de Taq Polimerasa Platinum, y 2 μL de ADN con una concentración máxima de 20 ng/ μL . El programa de termociclado fue el siguiente: denaturación inicial a 95°C por 15 min, seguido de denaturación a 94° C por 30 s, después annealing a 55 °C por 30 s, elongación a 72° C por 1 min, y elongación final a 72° C por 5 minutos; repitiéndose los pasos de denaturación a elongación por 40 ciclos.

Al usar este protocolo para algunos primers no se obtuvo amplificación o se presentaron inespecificidades, por lo que se realizó un gradiente de la temperatura de annealing, definiendo una diferente para 5 primers (Tabla 4).

Aunque esto solventó la mayoría de problemas, algunas muestras no amplificaron con dichas concentraciones de reactivos, ni programa de ciclado. Dado que estos problemas no parecían ser independientes del primer o de la muestra, se optó por realizar dichas amplificaciones a 45 ciclos, con lo cual se logró un producto de amplificación. Incluso así, existieron otras pocas muestras que aún no presentaban amplificación, para lo que se implementó un aumento a 1.5 min la etapa de Elongación.

6.7 Electroforesis en gel de agarosa

Después del programa de ciclado, se procedió a realizar un gel al 1.5% de agarosa y 0.003% de SYBR Safe; dado los tamaños de los amplicones que iban desde los 170 a los 320 pares de bases. Con este como matriz, se corrió la electroforesis de los amplicones obtenidos

de la reacción de PCR, a 100 V por 30 min, el cual posteriormente se reveló en exposición a luz UV por el fotodocumentador. Es de esta manera como se evidenció si la amplificación fue exitosa. De tener el amplicón adecuado, la muestra pasaba al envío de genotipado detallado a continuación.

6.8 Genotipado de producto de PCR para determinación de alelos.

Se llenaron en cada uno de los pocillos de la placa MicroAmp® Optical, desde 3 hasta 4 amplicones, los cuales debían cumplir con la condición de haber sido amplificados con diferentes fluoróforos. Estas placas una vez llenadas, fueron centrifugadas y enviadas a Macrogen Corea, en donde se llevó a cabo la electroforesis capilar por medio del secuenciador 3130 Genetic Analyzer. Tal como se mencionó en la sección 1.5 de la Introducción, esta técnica permitió obtener los tamaños en pares de bases de los alelos para cada amplicón genotipado.

Fue así como desde Macrogen Corea, se recibió un archivo .fsa por cada pocillo llenado en la placa. Estos archivos se analizaron en el software GeneMarker®, el cual permitió visualizar picos de absorbancia de cada amplicón a un determinado tamaño de pares de bases. Con esta información, se generó una matriz de tamaños de alelos por cada primer mPgCIR analizado (Anexo 5), para cada una de las 94 muestras.

6.9 Análisis de datos.

Para el presente estudio se realizó una matriz que abarca los alelos de los 94 individuos de *Psidium galapageium* de Santa Cruz e Isabela, genotipados; así como los alelos obtenidos de *Psidium guajava* obtenidos en estudios previos para estas dos islas, en los que también se usaron los primers mPgCIR (Urquía, 2018; Espín, 2018). Además, se incorporó la información de dos muestras mencionadas en el estudio de Urquía como HBGe1 y Psp_SCZ_02; que por sus características morfológicas, se reportaron como posibles híbridos entre las dos especies analizadas. En el presente estudio, se las mencionará como *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2*, respectivamente.

Con esta matriz de datos se llevó a cabo los siguientes análisis. En primer lugar, se la transformó en un formato .csv para usarla en el Software R. En este, se usó el paquete *adegenet* para calcular distancias genéticas euclidianas entre estas muestras, y posteriormente se usó el paquete *ade4* para generar un Análisis de Coordenadas Principales PCoA, mediante el comando *dudi.pco*.

Esta matriz también se transformó a un formato .stru, el cual permite correr estos datos en el software *Structure*. Para ejecutar los análisis de estructura poblacional en este, se creó un protocolo, en el cual se ingresó como priors: un modelo *admixture*, además de proponer 4 posibles agrupaciones para las muestras analizadas. Este modelo se probó con 1 millón de cadenas de Markov Monte Carlo y 1 millón también para *burnin*. Cada una de estas agrupaciones, se probó con 10 iteraciones. Los resultados obtenidos se comprimieron en una carpeta .zip, y se subieron a *Structure Harvester* para la determinación del K, o número de agrupaciones, óptimo.

Se usó el software *NewHybrids*, el cual calcula la probabilidad posterior de que un individuo pertenezca a un grupo parental o a un grupo de categoría híbrida (Anderson y Thompson, 2002). Los modelos que usa este programa, le permiten realizar inferencias a partir de marcadores moleculares dominantes y codominantes (Anderson, 2008).

Para el análisis en el software *NewHybrids*, se transformó la matriz .stru en una adecuada para software, por medio del programa PGD Spider. Se usó la consola no gráfica de *NewHybrids* para correr esta matriz se usó nuevamente un millón de cadenas de Markov Monte Carlo, y 200 mil de *burnin*. Dado que no se usó ninguna información genética extra, se escogió los parámetros correspondientes al modelo de Jeffreys, para correr estas simulaciones. Este modelo usa *priors* que permiten correr los análisis como resultado de una sola observación, en la que no se cuenta con información sobre frecuencias alélicas, teniendo como

resultado probabilidades posteriores muy similares a las obtenidas con el otro modelo disponible, que es el uniforme (Anderson y Thompson, 2002).

NewHybrids asigna a cada individuo analizado, a uno de 6 grupos ya establecidos por este software, entre ellos los denominados Grupo Puro 1, y Grupo Puro 2. Vale aclarar que estos dos grupos se refieren a cada una de las dos especies, o grupos genéticos distintos, que son los parentales para los posibles híbridos (Anderson y Thompson, 2002). Los otros 4 grupos propuestos son F1 que es el resultado de la cruce directa entre los dos grupos parentales, F2, es decir el resultado de la cruce entre dos individuos de la F1. Los dos últimos grupos pertenecen a los posibles retrocruces de la F1 con cada uno de los dos grupos parentales. Este programa ya tiene por *default* una matriz que caracteriza a cada uno de estos grupos por la frecuencia que tendrían para alelos exclusivos en cada uno de los grupos parentales (Anexo 6).

Finalmente, se usó el programa PGD Spider para transformar la matriz al formato del programa Coancestry, en el cual se corrió una simulación con 100 iteraciones, con un 95% de confiabilidad índices de parentesco, tales como el índice de Wang. Este índice representa el parentesco que existe entre dos individuos a partir de datos genéticos codominantes (Wang, 2017). La comparación que realiza este método permite obtener también un índice de parentesco entre grupos como un promedio de los parentescos entre sus individuos (Wang, 2002).

7. RESULTADOS

7.1 Extracción de ADN de *Psidium galapageium* y cuantificación.

Se extrajo el ADN de los 94 individuos de *Psidium galapageium* definidos en el área de estudio, y una vez cuantificadas estas extracciones, se obtuvo concentraciones muy variables entre las muestra, yendo desde 2.5 ng/ μ L hasta 386.2 μ L; teniendo una media de 45.2 ng/ μ L de ADN para todas las muestras extraídas. También se obtuvo lecturas de los índices de pureza

de extracción para cada una de las muestras, que son las relaciones de absorbancia 260/280 y 260/230. En cuanto a la primera, se presentan valores desde 0.84 a 2.66, con un promedio de 1.61; mientras que para la segundo se obtuvieron valores desde 0.58 a 2.59, con un valor promedio de 1.33.

7.2 Amplificación con primers heterólogos y genotipado

Se amplificaron por PCR las 94 muestras extraídas de *P. galapageium* con los 10 primers específicos para *P. guajava* seleccionados para este proyecto (Tabla 1). Las amplificaciones fueron consideradas exitosas si en la imagen de electroforesis en gel de agarosa, se presentaban bandas claras o tenues, alrededor del tamaño esperado para cada uno de los primers mPgCIR (Anexo 7). En total, se obtuvo una amplificación del 99.8%. En otras palabras, de las 940 reacciones realizadas, 2 no presentaron banda al analizar la electroforesis en gel de agarosa; de todas formas, el producto de PCR de estas también se envió a genotipar por electroforesis capilar en MacroGen Corea.

Al analizar los electroferogramas producto del genotipado (Anexo 8), se identificaron alelos para el 98,6% de las reacciones realizadas en este estudio, teniendo un 1,64% de datos que no se pudieron determinar (Anexo 9). Con este análisis, se determinó que los 10 loci analizados son polimórficos, al encontrar más de un alelo en cada uno de los locus analizados en todas las 94 muestras. Esto se evidencia en la Tabla 1, la cual indica cuantos alelos se encontraron por cada locus.

7.3 Análisis de datos

7.3.1 Alelos compartidos y exclusivos entre *P. galapageium*, *P. guajava* y las 2 muestras *Psidium sp.*

Tal como se observa en la Figura 1, al comparar los alelos obtenidos de muestras de *P. galapageium* y *P. guajava* con los primers mPgCIR, se identificaron tanto alelos exclusivos como compartidos entre estas dos especies. Del total de alelos reportados entre ellas, el 56.2%

pertenecen solo a individuos *P. galapageium*, mientras que para *P. guajava* se reportan 5.5% alelos exclusivos. El porcentaje de alelos compartidos entre las dos especies es de 38.4%.

Al incluir en este grupo los 17 alelos identificados en el individuo *Psidium sp. 1*, se evidencia en la Figura 2, como este individuo, comparte 4 de sus alelos (23%) con *P. galapageium* y *P. guajava*, 7 alelos (41%) solo con *P. galapageium*, y tiene 3 alelos exclusivos (17,64%). De la misma manera, se comparó los alelos que comparten las dos especies con el individuo denominado *Psidium sp. 2* (Figura 3). Este presenta 13 alelos, de los cuales comparte 2 alelos con ambas especies (15.38%); además tiene 10 alelos (76.92%) compartidos solo con *P. galapageium* y presenta solo 1 alelo exclusivo (7.69%).

En la Figura 4, se presenta un Diagrama de Venn que abarca a todos los alelos encontrados en los individuos de *P. galapageium* y *P. guajava*, así como en las 2 muestras *Psidium sp.* En este gráfico se evidencia que los alelos que *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2* comparten con *P. guajava*, son alelos que también se presentan en *P. galapageium*. De la misma manera, los 8 alelos que comparten *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2* entre ellos, coinciden con alelos reportados para *P. galapageium*.

7.3.2 Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

En la Figura 5 se observa el gráfico obtenido a partir del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), en el cual, el eje *x* representa el 77.02% de la variación de los alelos en los individuos analizados; mientras que el eje *y* solo representa el 7,48% de la variación existente en estos.

Al observar como se distribuyen los individuos a lo largo del eje *x*, se identificó dos agrupaciones principales con una apreciable distancia entre ellas, las cuales corresponden a *P. guajava* y *P. galapageium*. Se resalta como los individuos de *P. guajava* presentan una mayor dispersión entre ellos a lo largo de este eje, que los de *P. galapageium* dentro de estas agrupaciones.

En cuanto al individuo *Psidium sp.* 1, su ubicación en el eje x , se encuentra entre estas dos agrupaciones, tendiendo a estar un poco más cercano a la agrupación de *P. guajava*. Mientras tanto, el individuo *Psidium sp.* 2, se encuentra a la altura de varios individuos de *P. galapageium* a lo largo del eje x ; sin embargo, hay que destacar que a lo largo del eje y (7.48% de la variación existente), este se encuentra más alejado de esta agrupación.

7.3.3 Análisis de hibridación mediante *Structure*.

Al correr la matriz de datos en el programa *Structure* y en *Structure Harvester*, bajo los parámetros mencionados en metodología, se obtuvo que el K óptimo para el total de individuos analizados es de 2. Esta selección se hizo al comparar los valores de ΔK obtenidos de *Structure Harvester*, entre los cuales, el mayor fue $\Delta K = 4013.92$, correspondiente al $K=2$. Este valor es 4 órdenes de magnitud mayor que el ΔK de $K=3$, el cual tenía un valor de 0.75. Aunque también se corrió la simulación para $K=1$, $K=4$, y $K=5$; *Structure Harvester* no proporcionó valores para de ΔK para estos tres últimos.

Es en base a este $K=2$, que el modelo de estructura poblacional que mejor se ajusta a los datos analizados es el que presenta 2 linajes o acervos genéticos (Schoettle et al., 2011). De hecho, en la Figura 6, se evidencia como uno de estos linajes corresponde a los individuos *P. guajava* (color rojo); mientras que el otro corresponde a los individuos de *P. galapageium* (color verde). En esta figura se puede ver gráficamente como *Psidium sp.* 1, principalmente tiene una contribución del linaje de *P. galapageium*, también es notorio como existe una pequeña contribución del linaje de *P. guajava*.

Vale destacar que al observar detenidamente la Figura 6, a lo largo de los individuos de *P. guajava* y de *Psidium galapageium* analizados, se identifican otros individuos que también presentan mínimas contribuciones de más de un linaje. Sin embargo, es en *Psidium sp.* 1 que la contribución parece ser mayor que en éstos, y por lo tanto más distintiva. En cuanto a

Psidium sp. 2, este individuo ha sido asignado dentro del mismo linaje que los individuos de *P. galapageium*, presentando una franja a completa de color verde, en la Figura 6.

7.3.4 Asignación de individuos dentro de categorías híbridas mediante *NewHybrids*

Los resultados de este análisis infieren que los individuos de *P. galapageium* y *P. guajava* tienen una probabilidad superior a 99% de pertenecer a grupos puros (Tabla 2), los cuales representan los grupos parentales a partir de las cuales se darían los híbridos (Anderson y Thompson, 2002). Es así como se asignó un grupo puro para los individuos de *P. galapageium*, mientras que otro grupo puro para *P. guajava*.

También se evidencia como ninguna de las muestras tienen una probabilidad de pertenecer la categoría de hibridación F1, excepto *Psidium sp. 1*, el cual tiene una probabilidad de 0,002% de pertenecer a este grupo. En cuanto a la probabilidad de pertenecer al grupo F2, esta nunca es mayor al 0,01% y se encuentra distribuida en pocos individuos *P. galapageium* y *P. guajava*. Nuevamente, *Psidium sp. 1* es la excepción a este patrón, presentando una probabilidad del 6,28% de pertenecer a una categoría híbrida F2.

Solo los individuos de *P. guajava* tienen un porcentaje de pertenecer al grupo de Backcrossing 1, el cual corresponde al cruce de la F1 con *P. guajava*. De la misma forma, el grupo de Backcrossing 2, que corresponde al cruce de la F1 con *P. galapageium*, solo se presenta en individuos de guayabillo. *Psidium sp. 1* presenta porcentajes para estas dos categorías también, con un valor de 0,002% para el Backcrossing con *P. guajava* y de 9,64% para el Backcrossing con *P. galapageium*.

Otra forma de analizar los porcentajes de hibridación en cada uno de los individuos fue, sumar las probabilidades de que pertenezcan a las categorías híbridas F1, F2, Backcrossing 1 y Backcrossing 2; excluyendo a los grupos puros. Esto fue calculado de la misma manera por Zhang y colaboradores en el 2011. Esto se reporta en la Tabla 3, donde se indica a los individuos con una posibilidad $> 0,1\%$ de pertenecer a un grupo híbrido. Así, se logra

identificar como *Psidium sp. 1* tiene un 15,93% de probabilidad de pertenecer a uno de estos grupos de hibridación. En cuanto a los otros individuos, su porcentaje de no pertenecer a un grupo puro esta entre 0,9% y 0,1%.

El individuo *Psidium sp. 2* no presentó un porcentaje de pertenencia a un grupo híbrido, como se observa en la Tabla 2, se indica que este tiene el 99,975% de probabilidad de pertenecer a un grupo puro de *P. galapageium* y un 0,024% de probabilidad de pertenecer al grupo de Backcrossing 2, es decir la cruce de un individuo F1 con un *P. galapageium*.

7.3.5 Análisis de parentesco Coancestry

En la Tabla 4 se reportan los índices de Wang al comparar los individuos de cada especie en cada isla, así como los 2 individuos *Psidium sp. 1* y 2. Se obtuvo valores positivos al comparar individuos de la misma especie pertenecientes a la misma isla; por ejemplo, el índice de Wang entre individuos de *P. guajava* en Isabela es de 0.47, y entre individuos de *P. galapageium* en Isabela es de 0.22. Sin embargo, entre los individuos de *P. galapageium* de Santa Cruz este índice es ligeramente negativo con un valor a -0.08.

Al obtener los índices de Wang entre los individuos *Psidium sp.*, posibles híbridos, y las dos especies, se obtuvieron valores negativos, siendo todos estos menores a - 0.5. Así, por ejemplo, al comparar *P. galapageium* de Santa Cruz e Isabela, con *Psidium sp. 1* y 2, se obtuvo índices de -0.82 y -0.79 respectivamente; manteniendo este patrón al compararlos con individuos de *P. guajava* de ambas islas (Tabla 4). También vale destacar como el índice de Wang entre estos dos individuos *Psidium sp. 1* y 2, es de 0.28, siendo mayor incluso que, el que existe entre individuos de *P. galapageium* de Santa Cruz.

Así, es claro como las dos muestras *Psidium sp. 1* y 2 presentan el menor parentesco al compararlas con los individuos de *P. guajava* y *P. galapageium* de las dos islas; mientras que presentan el mayor parentesco entre ellas.

8. DISCUSIÓN

8.1 Regiones microsátélites mPgCIR para el estudio de *P. guajava* y *P. galapageium*.

Estudios en las Islas Santa Cruz e Isabela, reportan que a lo largo de estas islas hay espacios geográficos en los que *Psidium guajava* y *Psidium galapageium* co-existen (Anexo 9) (Aldaz y Tye, 1999; Valdebenito, 2018). Dada su asignación taxonómica dentro del mismo género *Psidium*, por caracteres morfológicos (Porter, 1968), se considera que *P. guajava* y *P. galapageium* están emparentadas, sugiriendo que comparten un ancestro común dentro de este género (Avisé y Ferguson, 1995).

En un proyecto realizado en 2016 por Ponce, se realizó un análisis preliminar para identificar posibles eventos de hibridación entre estas dos especies en la Isla Santa Cristóbal. En dicho proyecto, se logró la amplificación de 9 de 23 pares de primers mPgCIR específicos para *Psidium guajava* (Kanupriya et al., 2011), en muestras de *Psidium galapageium* (Ponce, 2016).

En el presente estudio, 10 de los 10 pares de primers probados, amplificaron en individuos *Psidium galapageium*, recolectados en la Isla Santa Cruz e Isabela. De estos 10 pares de primers, 7 son los mismos que fueron amplificados por Ponce en su proyecto. Estos fueron: mPgCIR05, mPgCIR10, mPgCIR11, mPgCIR13, mPgCIR17, mPgCIR18, y mPgCIR21. Los otros 3 pares de primers amplificados en el presente proyecto fueron: mPgCIR07, mPgCIR08 y mPgCIR09, los cuales se probaron ya que resultaron ser polimórficos en un estudio de diversidad genética de *P. guajava* en la isla de Santa Cruz (Urquía, 2018).

Tanto el presente proyecto como el de Ponce (2016) demuestran la amplificación de regiones microsátelite en individuos *Psidium galapageium* usando primers heterólogos específicos para *P. guajava*. A partir de esto, se puede inferir que las regiones flanqueantes a los 10 loci microsátélites amplificados, se mantienen conservadas en estas dos especies (Spooner, 2005).

Esto también se ha evidenciado en varios estudios que utilizan primers heterólogos, tales como el de Westman y Kresovich, quienes amplificaron loci microsatélite de *Arabidopsis thaliana*, en especies del género *Brassica*, demostrando que las regiones que limitan los SSR, pueden llegar a estar conservadas incluso entre géneros relacionados (Westman y Kresovich, 1998). De forma más puntual, existen estudios en los que se demuestran la transferibilidad de microsatélites de *Psidium guajava*, a especies de otros géneros dentro de la familia *Myrtaceae* (Nogueira et al., 2016).

Se sugiere que la diferente metodología usada en el genotipado, es la posible razón para que el presente proyecto reporte amplificación usando los primers mPgCIR07, mPgCIR08 y mPgCIR09, los cuales no presentaron transferibilidad a *P. galapageium* en el estudio de Ponce (2016). Sciacchiato manifiesta que el genotipado por poliacrilamida, además de ser laborioso y manejar reactivos químicos tóxicos; no ofrece una sensibilidad tan alta para detectar alelos en comparación a técnicas como la electroforesis capilar (Sciacchiato, 1996). Esto explicaría las dos muestras mencionadas en la sección 7.2 de Metodología, las cuales, a pesar de no tener una banda visible en el gel de agarosa, se mandaron a genotipar por esta técnica y mostraron picos de absorbancia en el electroferograma.

Otra evidencia de que las regiones que flanquean los microsatélites se encuentran conservadas en las dos especies, es que de los 32 alelos identificados en *P. guajava*, 28 coinciden con alelos de *P. galapageium*. De la misma forma, al analizar la cantidad total de alelos obtenidos para estas dos especies, estas comparten un 38.4% de alelos, entre todas las regiones microsatélite amplificadas en este estudio, como se menciona en la sección 7.1. Es así como, mediante el análisis de dichos alelos compartidos y no compartidos; así como su frecuencia, se puede establecer relaciones de parentesco entre dos especies (Westman y Kresovich, 1998), tal como se lo hará al final de esta discusión, incluyendo ya a los individuos de estudio *Psidium sp.* 1 y 2.

8.2 Grupos puros y posibles híbridos

Las dos agrupaciones que se observan en el análisis de coordenadas principales PCoA, coinciden con las dos especies en este estudio: *P. guajava* y *P. galapageium*. Como se mencionó en la sección 7.3.2, la distancia que mantienen los individuos a lo largo del eje x, brinda más información sobre que tanto se diferencian los individuos en base a sus distancias genéticas euclidianas (Kierepka y Latch, 2015). Dado que en este análisis este porcentaje de contribución es moderadamente alto, se sugiere que las dos agrupaciones presentadas corresponden a dos grupos taxonómicos claramente distintivos (Zhang et al., 2011), en este caso, la especie invasora y la endémica.

En el PCoA, el individuo *Psidium sp. 1* se encuentra entre el espacio que existe entre estas dos agrupaciones mencionadas. Frente a este patrón, varios estudios de hibridación sugieren que a este se lo puede denominar un individuo intermedio entre los dos taxones (Zhang et al., 2011; Schrey et al., 2007), o también se lo denomina un posible híbrido (Pisanu et al., 2011; Turcheto et al., 2015). Cabe mencionar que, aunque se encuentra intermedio entre estos dos grupos, este individuo *Psidium sp. 1*, parece tender a estar más próximo al agrupamiento de individuos de *P. guajava*, pudiendo presentar más parentesco con este grupo, que con el de *P. galapageium*.

Es de la misma manera que al analizar el individuo *Psidium sp. 2*, se sugiere que este guarda una mayor relación con los individuos *P. galapageium*, ya que este se encuentra a la misma altura que la agrupación de esta especie a lo largo del eje horizontal. Cabe destacar que los individuos de *P. galapageium* con los que *Psidium sp. 2* está próximo, son aquellos en el extremo de esta agrupación dirigiéndose hacia la zona intermedia entre *P. galapageium* y *Psidium guajava*. Así también es interesante como *Psidium sp. 2*, se encuentra a una mayor altura en el eje y, que cualquiera de los individuos *P. galapageium* con los que esta cercano. Si bien la dispersión de los individuos a lo largo este eje solo explica un 7% la variabilidad entre

ellos, esta observación es un indicio de que la relación de este individuo con los individuos de *P. galapageium* es cuestionable.

Para dilucidar cuál de las hipótesis planteadas es más probable para los individuos *Psidium sp. 1* y *2*, se realizó el análisis de estructura poblacional con el software *Structure*, obteniendo un modelo óptimo de dos agrupaciones para todos los individuos analizados. Nuevamente como en el PCoA, éstas dos corresponden a los individuos de *P. guajava* y *P. galapageium*. Este análisis destaca que el individuo *Psidium sp. 1*, tiene una contribución del linaje de *P. galapageium* y *P. guajava*; aunque la de esta última se presenta en menor cantidad. Mientras tanto, el individuo *Psidium sp. 2* solo presenta un linaje de *P. galapageium*.

Como se mencionó en la sección 7.3.3, el número de agrupaciones óptimas obtenido fue de 2 (Figura 6). Mientras tanto, al analizar el gráfico de estructura poblacional que contempla 3 agrupaciones (Figura 7), se obtuvo que la estructura en los dos posibles individuos híbridos se mantiene, mientras que los individuos de *P. galapageium*, ahora presentan dos grupos, uno de los cuales corresponde casi en su totalidad a los individuos de la Isla Isabela, y en menor cantidad a los individuos de la Isla Santa Cruz.

Diferentes estudios de hibridación realizan el análisis de estructura poblacional con *Structure*, en el cual incluyen individuos híbridos previamente identificados, además de los parentales. De este obtienen que los individuos híbridos suelen presentar una contribución notoria de ambos linajes parentales (Zhang et al., 2011; Ladner y Palumbi, 2012; Burgarella et al., 2009). Esto se interpretaría como evidencia de mezcla o *admixture* entre las dos especies parentales del híbrido. Este patrón de contribución de más de un linaje es claro para el individuo *Psidium sp. 1*, pero dado que dicha contribución se muestra como pequeña, se propuso realizar análisis que distingan híbridos de individuos puros o parentales.

Además, el análisis de híbridos mediante el software *Structure*, presenta una limitación, la cual es que no puede distinguir en eventos de hibridación reciente (Anderson, 2008). Es por

esta razón que, se analizaron los alelos obtenidos con el software *NewHybrids*, el cual infiere la probabilidad posterior de que los individuos pertenezcan a grupos parentales, híbridos F1, F2, o retrocruces. Mediante este, se asignó una probabilidad del 15.92% a que el individuo *Psidium sp.* 1 pertenezca a un grupo híbrido, el cual se compone de un 6.28% de probabilidad de ser un individuo F2 de la cruce de estas dos especies, y un 9,64% de probabilidad de ser un individuo resultante de una cruce entre un híbrido F1 y *P. galapageium*.

El individuo *Psidium sp.* 1 es el que presenta la mayor probabilidad de pertenecer a un grupo híbrido, de todos los analizados. Se considera que esta probabilidad del 15.92%, ofrece un sustento bajo de que un individuo sea verdaderamente un híbrido. Esto se infiere en base a lo postulado por Zhang y otros, quienes, refiriéndose a este software, sugieren que probabilidades entre 5 y 50% de pertenecer a un grupo híbrido, ofrecen un sustento bajo a moderado de que un individuo pertenezca realmente a estos grupos; y que se necesita una probabilidad entre 50% y 100% para tener un sustento moderado a alto, de que si pertenece a tal categoría (Zhang et al., 2011). Vale mencionar que el individuo *Psidium sp.* 2 presenta un 99,9975% de probabilidad de pertenecer al grupo de *Psidium galapageium*, asignación que concuerda con lo obtenido en los análisis en el PCoA y *Structure*.

Este mismo sistema de análisis es aplicado por varias investigaciones que usaron este software tales como estudios de hibridación en robles (Burgarella et al., 2009), gatos silvestres (Olivira et al., 2015) y orquídeas (Pinheiro et a., 2010); determinando así que individuos tienen la mayor probabilidad de pertenecer a un grupo híbrido.

Entonces se tiene que el individuo *Psidium sp.* 1, si bien presenta una contribución del linaje de *P. guajava* según *Structure*, y una cercanía a este taxón según el PCoA; este no tiene sustento suficiente para asignarlo con como un individuo híbrido, según el análisis realizado por *NewHybrids*. Esto apuntaría a que este individuo parece estar mayormente relacionado con la especie *P. galapageium*, pudiendo ser un individuo de esta especie genéticamente

divergente. Por otro lado, *Psidium sp. 2*, bajo estos tres análisis, indica estar altamente relacionado con *P. galapageium*.

Para comprobar este parentesco que existiría entre *P. galapageium* y las dos muestras *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2*, se llevó a cabo un análisis Coancestry. Tal como se mencionó en la sección 6.9, este análisis permite obtener un índice de parentesco entre cada individuo de un grupo al compararlo con otro individuo, de modo que es posible realizar inferencias en base a índices obtenidos entre cada uno de los dos posibles individuos híbridos, con el resto de grupos para determinar su parentesco.

En la sección 7.3.5, ya se mencionó que estos dos individuos presentan índices de Wang moderadamente negativos al analizarlos tanto con los individuos de *Psidium guajava*, como con *Psidium galapageium*. Wang menciona que el obtener valores negativos para este índice, indica que las especies están muy poco relacionadas taxonómicamente, pudiendo ser una especie o posibles híbridos (Wang, 2014). Sin embargo, es interesante como el índice de Wang para estas dos muestras es de 0.28, el cual indica que estos dos individuos tienen un nivel moderado de parentesco entre sí.

Es en base a este último análisis que no se cierra la posibilidad de que estos individuos sean en efecto, producto de eventos de hibridación recientes o que se hayan dado hace ya generaciones atrás. Además, aparece una nueva hipótesis de que estos individuos pueden pertenecer a una especie diferente, posiblemente del mismo género *Psidium sp.*

8.3 Consideraciones en estudios de hibridación

Vale recalcar que para que existan eventos de hibridación se debería superar las barreras reproductivas de cada especie, así como no tener incompatibilidad gametofítica, y producir individuos con un *fitness* que les permita sobrevivir en el ambiente (Stebbins, 1969). Otras consideraciones al estudiar eventos de hibridación, son aquellas espacio temporales y

ecosistémicas que permitirían que los híbridos, una vez formados sean estables a lo largo de las generaciones (Reisenberg, 1997).

Al momento de realizar este estudio, no se contó con información sobre compatibilidad sexual, viabilidad de la cruce de ambas especies, o una descripción detallada del ecosistema en las que cohabitan ambas especies. Lo que si se tiene es una fecha aproximada en la que *Psidium guajava* fue introducida en las islas, siendo esta entre los años 1850 y 1860 (Walsh et al., 2008). Bajo esta afirmación, se sugiere que *Psidium guajava* tiene al menos 160 años en las islas desde dicha introducción, sin embargo, tampoco se tienen fechas sobre su escape del estado de cultivo, ni tampoco se tiene reportes de desde cuando se evidenció que esta crece junto a *Psidium galapageium*.

De la misma manera, existen varios estudios con las mismas interrogantes sobre el tiempo en el que eventos de hibridación se han llevado a cabo (Cardi et al., 1993, Ladner y Palumbi, 2012). Según Mooney y Cleland, depende de las características reproductivas y de adaptabilidad de cada especie invasiva, así de como también depende del tipo de ecosistema que invade, para que los efectos de dicha especie se evidencien en una determinada cantidad de años (Mooney y Cleland, 2001). Es así como estos autores mencionan ciertos ejemplos, uno de ellos en las que a los 14 años, especies de lagartijas muestran ya adaptaciones morfológicas a las islas colonizadas.

Otro ejemplo más puntual, es la hibridación entre dos tipos de ciervos en Gran Bretaña, a partir de una especie endémica y una introducida desde Japón hace aproximadamente 100 años, mostrando ya cierta amenaza al venado nativo (Mooney y Cleland, 2001). También existe un estudio de hibridación entre *Spartina marítima* endémica, y *Spartina alterniflora*, introducida en Southampton, Inglaterra; para el cual se registran que se evidenciaron individuos híbridos 70 años después de la introducción de dicha especie (Terje et al., 1999).

Es con esta información que no se puede descartar que durante los 160 años, aproximadamente, de presencia de *P. guajava* en Galápagos, se hayan dado los eventos de hibridación necesarios para generar híbridos estables. Frente a esto, hay que tomar en consideración el escape de esta al ecosistema, y la adaptabilidad de los híbridos en este.

9. CONCLUSIONES

- Este estudio demuestra que es posible amplificar microsatélites de individuos *Psidium galapageium*, con primers mPgCIR específicos para *Psidium guajava*.
- Los loci microsatélite analizados en estas dos especies, sugieren que, si bien estas tienen alelos exclusivos, también comparten varios alelos entre sí.
- Tres diferentes análisis, PCoA, Structure, y NewHybrids; indican que los individuos de *Psidium galapageium* y *Psidium guajava* se pueden identificar claramente como dos grupos taxonómicos diferentes.
- El individuo *Psidium sp.* 1 presenta una contribución mayoritaria del linaje observado en individuos de *Psidium galapageium*, aunque también presenta en menor grado contribución del linaje de *Psidium guajava*.
- De todos los individuos analizados, el individuo *Psidium sp.* 1, es el que presentó una mayor probabilidad de pertenecer a un grupo híbrido, con un 15%.
- El individuo *Psidium sp.* 2. tiene el mismo linaje *Psidium galapageium*, así como una probabilidad del 99% de pertenecer a este grupo.
- En base a índices de parentesco, no se descarta la posibilidad de que *Psidium sp.* 1 y *Psidium sp.* 2, estén relacionados con individuos híbridos, o formen parte de una tercera especie.

10. RECOMENDACIONES

- Recolectar más muestras que presenten las mismas características morfológicas que aquellas presentes en *Psidium sp. 1* y *Psidium sp. 2*; de modo que se puedan ejecutar estos análisis con un número de muestras mayor.
- Estudiar la compatibilidad sexual entre individuos *Psidium galapageium* y *Psidium guajava*, así también entre estas dos especies y los posibles híbridos.
- Caracterizar las zonas en las que co-existen *Psidium galapageium* con *Psidium guajava*, de modo que se obtengan tanto datos de dichos ecosistemas, los cuales permitirían proponer bajo que condiciones crecerían posibles híbridos entre estas dos especies.
- Usar otros marcadores moleculares como mitocondriales para analizar patrones evolutivos, de modo que se establezcan relaciones filogenéticas entre estas dos especies, los posibles híbridos, o diferentes especies relacionadas.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adersen, A., Adersen, H., Brimer, L. (1988). Cyanogenic constituents in plants from the Galapagos Islands. *Biochemical Systematics and Ecology*, 16(1), 65-77.
- Aldaz, I., Tye, A. (1999). Effects of the 1997-98 El Niño event on the vegetation of Alcedo Volcano, Isabela Island. *Noticias de Galápagos*, 60, 25-28.
- Anderson, E. (2008). Bayesian inference of species hybrids using multilocus dominant genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1505), 2841-2850.
- Anderson, E. C., Thompson, E. A. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, 160(3), 1217-1229.
- Aptroot, A., Bungartz, F. (2007). The lichen genus *Ramalina* on the Galapagos. *The Lichenologist*, 39(6), 519-542.
- Arnold, M. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York.
- Arnold, M. L. (1992). Natural hybridization as an evolutionary process. *Annual review of Ecology and Systematics*, 23(1), 237-261.
- Avise, J., Ferguson, M. (1995). Molecular markers, natural history and evolution. *Systematic Biology*, 44(1), 117-119.
- Blackett, M., Robin, R., Good, R., Lee, S. y Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources* 12: 456- 463.
- Bungartz, F. (2008). *Cyanolichens of the Galapagos Islands—the genera Collema and Leptogium*. na.
- Buren, L. L., Mock, J. J., Anderson, I. C. (1974). Morphological and Physiological Traits in Maize Associated with Tolerance to High Plant Density 1. *Crop science*, 14(3), 426-429.
- Burgarella, C., Lorenzo, Z., Jabbour-Zahab, R., Lumaret, R., Guichoux, E., Petit, R. J., Gil, L. (2009). Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, 102(5), 442.
- Butler, J. (2005). *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. Elsevier.
- Cardi, T., D'Ambrosio, E., Consoli, D., Puite, K. J., Ramulu, K. S. (1993). Production of somatic hybrids between frost-tolerant *Solanum commersonii* and *S. tuberosum*: characterization of hybrid plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 87(1-2), 193-200.
- Cazco, C. (2018). Determinación de la diversidad genética y estructura poblacional del guayabillo (*Psidium galapageium*) en la Isla Isabela, Galápagos, Ecuador. Quito: USFQ.
- Cimadam, A., Causton, C., Cha, D. H., Damiens, D., Fessl, B., Hood-Nowotny, R., Teale, S. (2016). Darwin's finches treat their feathers with a natural repellent. *Scientific reports*, 6, 34559.
- Daehler, C., Carino, D. (2001). Hybridization between native and alien plants and its consequences. In *Biotic homogenization* (pp. 81-102). Springer, Boston, MA.

- Dal Forno, M., Bungartz, F., Yáñez-Ayabaca, A., Lücking, R., Lawrey, J. D. (2017). High levels of endemism among Galapagos basidiolichens. *Fungal diversity*, 85(1), 45-73.
- Dowling TE and Childs MR (1992) Impact of hybridization on a threatened trout of the Southwestern United States. *Conservation Biology* 6: 355–364
- Dray, S. et al (2018). Package ‘ade4’ (Versión 1.7-8) [Software]. Obtenido el 6 de mayo 2017 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/ade4.pdf>
- Earl, D. A., vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Edwards RJ (1979) A report of Guadalupe bass *Micropterus treculi* x smallmouth bass *Micropterus dolomieu* hybrids from two localities in the Guadalupe River, Texas, U.S.A. *Texas Journal of Science* 31: 231–238
- Ellstrand, N. C., Heredia, S. M., Leak-Garcia, J. A., Heraty, J. M. (2010). Crops gone wild: evolution of weeds and invasives from domesticated ancestors. *Evolutionary Applications*, 3(5-6), 494-504.
- Espín, D. (2018). Diversidad Genética de la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla Isabela. Quito: USFQ.
- Goudet, J. Jombart, T. (2018). Package ‘hierfstat’(Versión 0.04-22) [Software]. Obtenido el 18 de octubre 2018 de <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>
- Guerrero, A. M., Tye, A. (2009). Darwin's Finches as seed predators and dispersers. *The Wilson Journal of Ornithology*, 121(4), 752-765.
- Hamann, O. (2001). Demographic studies of three indigenous stand-forming plant taxa (Scalesia, Opuntia, and Bursera) in the Galápagos Islands, Ecuador. *Biodiversity Conservation*, 10(2), 223-250.
- Heller, C., Altria, K. D. (Eds.). (1997). *Analysis of nucleic acids by capillary electrophoresis* (Vol. 1). Braunschweig: Vieweg.
- Henry, R. J. (Ed.). (2001). *Plant genotyping: the DNA fingerprinting of plants*. CABI.
- Heywood, V., Jackson, P. (2012). *Tropical botanic gardens: their role in conservation and development*. Academic Press.
- Horst, L., Wenzel, G. (2007). *Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement* (Vol. 55). Springer Science Business Media.
- Jackson, M. H. (1993). *Galapagos, a natural history*. University of Calgary press.
- Jäger H, Kowarik I, Tye A (2009) Destruction without extinction: long-term impacts of an invasive tree species on Galápagos highland vegetation. *J Ecol* 97:1252–1263
- Jombart, T. (2015). An introduction to adegenet 2.0.0. Obtenido el 30 de agosto 2017 de <http://adegenet.r-forge.r-project.org/files/tutorial-basics.pdf>
- Kanupriya, Latha, P. M., Aswath, C., Reddy, L., Padmakar, B., Vasugi, C., Dinesh, M. R. (2011). Cultivar identification and genetic fingerprinting of guava (*Psidium guajava*) using microsatellite markers. *International journal of fruit science*, 11(2), 184-196.
- Kaundun, S., Matsumoto, S. (2002). Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome*, 45(6), 1041-1048.
- Keenan, K. (2017). Package ‘diveRsity’(Versión 0.04-22) [Software]. Obtenido el 6 octubre 2018 de <https://cran.r-project.org/web/packages/diveRsity/diveRsity.pdf>

- Kierepka, E., Latch, E. (2015). Performance of partial statistics in individual-based landscape genetics. *Molecular Ecology Resources*, 15(3), 512-525.
- Ladner, J., Palumbi, S. (2012). Extensive sympatry, cryptic diversity and introgression throughout the geographic distribution of two coral species complexes. *Molecular Ecology*, 21(9), 2224-2238.
- Lambert, R. J., Johnson, R. R. (1978). Leaf Angle, Tassel Morphology, and the Performance of Maize Hybrids 1. *Crop Science*, 18(3), 499-502.
- Levin, D. A., Francisco-Ortega, and R. K. Jansen. (1996). Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conservation Biology* 10:10-16.
- López-Caamal, A., Cano-Santana, Z., Jiménez-Ramírez, J., Ramírez-Rodríguez, R., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Is the insular endemic *Psidium socorrense* (Myrtaceae) at risk of extinction through hybridization?. *Plant systematics and evolution*, 300(9), 1959-1972.
- Mayr E. 1963. *Animal Species and Evolution*. Cambridge, MA: Harvard Univ. Press
- Mooney, H. A., Cleland, E. E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(10), 5446-5451.
- McMullen, C. K. (1999). *Flowering plants of the Galápagos*. Cornell University Press.
- Nishimura, O., Yamaguchi, K., Mihara, S., Shibamoto, T. (1989). Volatile constituents of guava fruits (*Psidium guajava* L.) and canned puree. *Journal of agricultural and food chemistry*, 37(1), 139-142.
- Nogueira, A. M., Ferreira, A., Silva Ferreira, M. F. (2016). Transferability of microsatellites from *Psidium guajava* to *Eugenia*, *Myrciaria*, *Campomanesia*, and *Syzygium* species (Myrtaceae). *Plant molecular biology reporter*, 34(1), 249-256.
- Oliveira, R., Randi, E., Mattucci, F., Kurushima, J., Lyons, L., Alves, P. (2015). Toward a genome-wide approach for detecting hybrids: informative SNPs to detect introgression between domestic cats and European wildcats (*Felis silvestris*). *Heredity*, 115(3), 195.
- Paradis, E. et al. (2018b). Package ‘pegas’ (Versión 0.10) [Software]. Obtenido el 20 de septiembre 2018 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf>
- Pritchard, J. (1998). STRUCTURE (Versión 2.3.4) [Software]. Stanford University
- Ponce, S. (2016). Determinación de la diversidad genética del guayabillo (*Psidium galapegeium*) y comparación con la diversidad genética encontrada en la guayaba (*Psidium guajava*) en la Isla San Cristóbal, Galápagos, Ecuador. Quito: USFQ.
- Pinheiro, F., de Barros, F., Meyer, D., Fay, M. F., Suzuki, R. M., Cozzolino, S. (2010). Hybridization and introgression across different ploidy levels in the Neotropical orchids *Epidendrum fulgens* and *E. puniceoluteum* (Orchidaceae). *Molecular Ecology*, 19(18), 3981-3994.
- Pisanu, S., Mameli, G., Farris, E., Binelli, G., Filigheddu, R. (2011). A natural homoploid hybrid between *Centaurea horrida* and *Centaurea filiformis* (Asteraceae) as revealed by morphological and genetic traits. *Folia Geobotanica*, 46(1), 69-86.
- Pollegioni, P., Major, A., Bartoli, S., Ducci, F., Proietti, R., Malvolti, M. E. (2004, November). Application of microsatellite and dominant molecular markers for the discrimination of species and interspecific hybrids in genus *Juglans*. In *V International Walnut Symposium 705* (pp. 191-197).

- Porter, D. (1968). *Psidium* (Myrtaceae) in the Galápagos Islands. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 368-371.
- Puga, B., Morales, S., Nuñez, L., Carvajal, O., Santander, S., Aragón, E. (2017). Comparison of the effect of three food diets provided to giant tortoises (*Chelonoidis guntheri* and *Chelonoidis vicina*) bred in captivity at Isabela Island–Galápagos.
- Rieseberg, L. (1997). Hybrid origins of plant species. *Annual review of Ecology and Systematics*, 28(1), 359-389.
- RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R (Versión 3.4.2) [Software]. RStudio, Inc. Obtenido el 20 de septiembre 2018 de <https://cran.rproject.org/bin/windows/base/>
- Schrey, A. W., Sloss, B. L., Sheehan, R. J., Heidinger, R. C., Heist, E. J. (2007). Genetic discrimination of middle Mississippi River Scaphirhynchus sturgeon into pallid, shovelnose, and putative hybrids with multiple microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 8(3), 683-693.
- Schultz, A. D. (2003). The Galapagos giant tortoise (*Geochelone elephantopus*) and the spread of invasive plants.
- Sciacchitano, C. (1996). Analysis of polymerase chain reaction-amplified DNA fragments of *Clostridium botulinum* type E neurotoxin gene by high performance capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography Related Technologies*, 19(13), 2165-2178.
- Seehausen, O. L. E., Takimoto, G., Roy, D., Jokela, J. (2008). Speciation reversal and biodiversity dynamics with hybridization in changing environments. *Molecular ecology*, 17(1), 30-44.
- Skulason S, Smith TB (1995) Resource polymorphisms in vertebrates. *Trends in Ecology Evolution*, 10, 366–370.
- Soares, F., Pereira, T., Marques, M., Monteiro, A. (2007). Volatile and non-volatile chemical composition of the white guava fruit (*Psidium guajava*) at different stages of maturity. *Food Chemistry*, 100(1), 15-21.
- SoftGenetics LLC. (2012). Software GeneMarker® [Software]
- Somarriba, E. (1986). Effects of livestock on seed germination of guava (*Psidium guajava* L.). *Agroforestry Systems*, 4(3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/BF02028357>
- Soria, A. Estandarización de primers específicos y análisis de diversidad genética de *Psidium galapageium* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Quito: USFQ.
- Spooner, D. (2005). *Molecular markers for genebank management* (No. 10). Bioversity International.
- Stebbins, G. (1969). The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon*, 26-35.
- Stebbins, G. L. (1969). The significance of hybridization for plant taxonomy and evolution. *Taxon*, 26-35.
- Terje, S., Schei, P. J., Viken, Å. (1999). Invasive species and biodiversity management (Vol. 24). Springer Science Business Media.
- Tomar, R. S. (2010). *Molecular markers and plant biotechnology*. New India Publishing.

- Torres, M., Gutiérrez, B. (2018). A Preliminary Assessment of the Genetic Diversity and Population Structure of Guava, *Psidium guajava*, in San Cristobal. In *Understanding Invasive Species in the Galapagos Islands* (pp. 3-17). Springer, Cham.
- Traveset, A., Nogales, M., Vargas, P., Rumeu, B., Olesen, J. M., Jaramillo, P., Heleno, R. (2016). Galápagos land iguana (*Conolophus subcristatus*) as a seed disperser. *Integrative zoology*, 11(3), 207-213.
- Traveset, A., Nogales, M., Vargas, P., Rumeu, B., Olesen, J. M., Jaramillo, P., Heleno, R. (2016). Galápagos land iguana (*Conolophus subcristatus*) as a seed disperser. *Integrative zoology*, 11(3), 207-213.
- Turchetto, C., Segatto, A. L. A., Beduschi, J., Bonatto, S. L., Freitas, L. B. (2015). Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants*, 7.
- Tye, A. (2006). The status of the endemic flora of Galapagos: the number of threatened species is increasing. *Galápagos report*, 2007, 96-103.
- Urquía, D. (2018). Estudio de la diversidad genética de la población de *Psidium guajava* en la isla Santa Cruz, Galápagos. Quito: USFQ.
- Valdebenito, H. (2018). A Study Contrasting Two Congener Plant Species: *Psidium guajava* (Introduced Guava) and *P. galapageium* (Galapagos Guava) in the Galapagos Islands. In *Understanding Invasive Species in the Galapagos Islands* (pp. 47-68). Springer, Cham.
- Vilà, M., Weber, E., Antonio, C. (2000). Conservation implications of invasion by plant hybridization. *Biological invasions*, 2(3), 207-217.
- Walsh, S. J., McCleary, A. L., Mena, C. F., Shao, Y., Tuttle, J. P., González, A., Atkinson, R. (2008). QuickBird and Hyperion data analysis of an invasive plant species in the Galapagos Islands of Ecuador: Implications for control and land use management. *Remote Sensing of Environment*, 112(5), 1927-1941.
- Wang, J. (2014). Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(3), 518-530.
- Wang, J. 2011. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources* 11(1): 141-145.
- Wang, J. (2002). An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, 160(3), 1203-1215.
- Westman, A.L., and Kresovich, S. 1998. The potential for cross-taxa simple-sequence repeat (SSR) amplification between *Arabidopsis thaliana* L., and crop brassicas. *Theor. Appl. Genet.* 96: 272–281.
- Whickham, W. Chang, W. (2018). Package ‘ggplot2’ (Versión 2.2.1) [Software]. Obtenido el 18 de septiembre 2018 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>
- Wiggins, I. L., Porter, D. M., Anderson, E. (1971). *Flora of the Galápagos Islands*. Stanford University Press.
- Zhang, Y., Zalapa, J., Jakubowski, A. R., Price, D. L., Acharya, A., Wei, Y., Casler, M. D. (2011). Natural hybrids and gene flow between upland and lowland switchgrass. *Crop Science*, 51(6), 2626-2641

12. TABLAS

Tabla 1. Primers mPgCIR usados, secuencia, temperatura de annealing determinada, y número de alelos encontrados.

Loci mPgCIR	Secuencia de Primer Forward (5'-3') (no incluye secuencia de cola universal)	Secuencia de Primer Reverse (5'-3')	T. de annealing (°C)	No. de Alelos encontrados	Rango de tamaño encontrado para alelos (pares de bases)
05	GCCTTTGAACCACATC	TCAATACGAGAGGCAATA	55	9	170-260
07	ATGGAGGTAGGTTGATG	CGTAGTAATCGAAGAAATG	55	15	134-180
08	ACTTTCGGTCTCAACAAG	AGGCTTCTACAAAAGTG	57	8	268-270
09	GCGTGTGCGTATTGTTTC	ATTTTCTTCTGCCTTGTC	55	9	194-246
10	GTTGGCTCTTATTTGGT	GCCCCATATCTAGGAAG	58	16	268-270
11	TGAAAGACAACAAACGAG	TTACACCCACCTAAATAAGA	55	10	214-332
13	CCTTTTTCCCGACCATTACA	TCGCACTGAGATTTTGTGCT	57	12	250-270
17	CCTTTCGTCATATTTCACTT	CATTGGATGGTTGACAT	57	22	190-260
18	TAAGCTGCATGTGTGC	ATGGCTTTGGATGAAA	55	14	176-204
21	TGCCCTTCTAAGTATAACAG	AGCTACAAACCTTCCTAAA	59	24	150-200

En la presente tabla se presentan las secuencias forward y reverse para cada uno de los primers utilizados en este proyecto, los cuales son específicos para guayaba. Además, se indica la temperatura de annealing con la que se estandarizó la PCR. También se indican el número de alelos que se encontró para cada uno de estos, y el rango de tamaño en pares de bases que tuvieron estos alelos.

Tabla 2. Probabilidad de pertenencia de 22 (de las 272 en total) individuos a 6 diferentes grupos puros o híbridos.

Información Individuos		Probabilidad de pertenecer a grupos puros		Probabilidad de pertenecer a grupos híbridos			
Individuo	Especie e Isla	Guayaba	Guayabillo	F1 (Guayaba* Guayabillo)	F2 (F1*F1)	BC1 (F1*Guayaba)	BC2 (F1*Guayabillo)
CH6	Guayaba SantaCruz	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
EC1	Guayaba SantaCruz	99.900%	0.000%	0.000%	0.015%	0.085%	0.000%
EC2	Guayaba SantaCruz	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
EC3	Guayaba SantaCruz	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
GUA2	Guayaba SantaCruz	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
GUA3	Guayaba SantaCruz	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
GME2	Guayaba Isabela	99.999%	0.000%	0.000%	0.000%	0.001%	0.000%
GME3	Guayaba Isabela	99.912%	0.000%	0.000%	0.012%	0.076%	0.000%
GME4	Guayaba Isabela	100.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
YCAM2	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.987%	0.000%	0.000%	0.000%	0.013%
YCAM3	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.958%	0.000%	0.000%	0.000%	0.041%

YCAM4	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.953%	0.000%	0.001%	0.000%	0.047%
YCAM5	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.981%	0.000%	0.000%	0.000%	0.019%
YCAS1	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.965%	0.000%	0.001%	0.000%	0.034%
YRG1	Guayabillo Isabela	0.000%	99.999%	0.000%	0.000%	0.000%	0.001%
YRG2	Guayabillo Isabela	0.000%	99.999%	0.000%	0.000%	0.000%	0.001%
YRG3	Guayabillo Isabela	0.000%	99.990%	0.000%	0.000%	0.000%	0.010%
YRG4	Guayabillo Isabela	0.000%	99.999%	0.000%	0.000%	0.000%	0.001%
YRG5	Guayabillo Isabela	0.000%	99.999%	0.000%	0.000%	0.000%	0.001%
Psidiumsp1	Psidium_sp SantaCruz	0.000%	84.076%	0.002%	6.282%	0.001%	9.640%
Psidiumsp2	Psidium_sp SantaCruz	0.000%	99.975%	0.000%	0.000%	0.000%	0.024%

En esta tabla, se presentan solo 22 individuos dentro del análisis en NewHybrids, en los que constan individuos de Guayaba, Guayabillo y dos posible híbrido. En esta evidente como todos los individuos de Guayaba y Guayabillo tienen una probabilidad superior a 99,9% de pertenecer a grupos puros; mientras que tienen 0% de pertenecer al grupo puro de la otra especie, lo cual es constante en todas las 272 muestras analizadas.

Tabla 3. Individuos con porcentaje mayor al 0.1% de pertenecer a grupos híbridos

Información Individuos		Prob. de pertenecer a grupos puros		Probabilidad de pertenecer a grupos híbridos				Suma de probabilidad de pertenecer a grupos híbridos
Individuo	Especie e Isla	Guayaba	Guayabillo	F1 (Guayaba* Guayabillo)	F2 (F1*F1)	BC1 (F1* Guayaba)	BC2 (F1* Guayabillo)	
Psidium_sp1	Psidium_sp SantaCruz	0.000%	84.076%	0.002%	6.282%	0.001%	9.640%	15.925%
YOCC2	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.066%	0.000%	0.045%	0.000%	0.889%	0.934%
YCAM1	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.292%	0.000%	0.091%	0.000%	0.617%	0.708%
YMAN1	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.800%	0.000%	0.005%	0.000%	0.195%	0.200%
YBE2	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.834%	0.000%	0.002%	0.000%	0.164%	0.166%
YBE1	Guayabillo SantaCruz	0.000%	99.892%	0.000%	0.001%	0.000%	0.107%	0.108%
EC1	Guayaba SantaCruz	99.900%	0.000%	0.000%	0.015%	0.085%	0.000%	0.100%

En esta tabla se presentan los individuos con una probabilidad mayor al 0,1% de pertenecer a grupos híbridos. Este valor se calculo al sumar las probabilidades de que pertenezcan a las categorías F1, F2, BC1, BC2; de modo que se excluye a los grupos puros. Esto fue calculado de la misma manera por (Zhang et al., 2011). Así, se logra identificar como el posible individuo híbrido tiene un 15,93% de porcentaje de pertenecer a un grupo híbrido. En cuanto a los otros individuos, su porcentaje de no pertenecer a u grupo puro esta entre 0,9% y 0,1%.

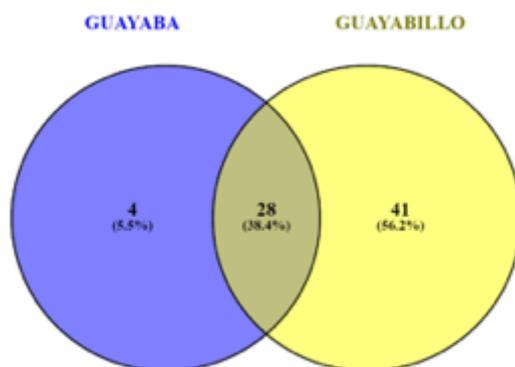
Tabla 4. Índices de Wang comparados entre *Psidium guajava*, *Psidium galapageium*, y las dos muestras a identificar

Grupo 1	Grupo 2	Índice de Wang
Guayaba Isabela	Guayaba Isabela	0.468
Guayaba Isabela	Guayaba Santa Cruz	0.237
Guayaba Isabela	Guayabillo Isabela	-0.822
Guayaba Isabela	Guayabillo Santa Cruz	-0.757
Guayaba Santa Cruz	Guayaba Santa Cruz	0.243
Guayaba Santa Cruz	Guayabillo Isabela	-0.831
Guayaba Santa Cruz	Guayabillo Santa Cruz	-0.772
Guayabillo Santa Cruz	Guayabillo Santa Cruz	-0.083
Guayabillo Isabela	Guayabillo Isabela	0.215
Guayabillo Santa Cruz	Guayabillo Isabela	-0.144
Psidiumsp1	Guayaba Isabela	-0.52
Psidiumsp1	Guayaba Santa Cruz	-0.562
Psidiumsp1	Guayabillo Isabela	-0.885
Psidiumsp1	Guayabillo Santa Cruz	-0.818
Psidiumsp2	Guayaba Isabela	-0.859
Psidiumsp2	Guayaba Santa Cruz	-0.809
Psidiumsp2	Guayabillo Isabela	-0.849
Psidiumsp2	Guayabillo Santa Cruz	-0.791
Psidiumsp1	Psidiumsp2	0.278

La presente tabla indica los índices de Wang obtenidos al comparar dos poblaciones. Para obtener estos, se compara un grupo con el otro, los cuales se formaron dependiendo de la especie y la isla. Los dos individuos posibles híbridos se consideraron como un solo grupo.

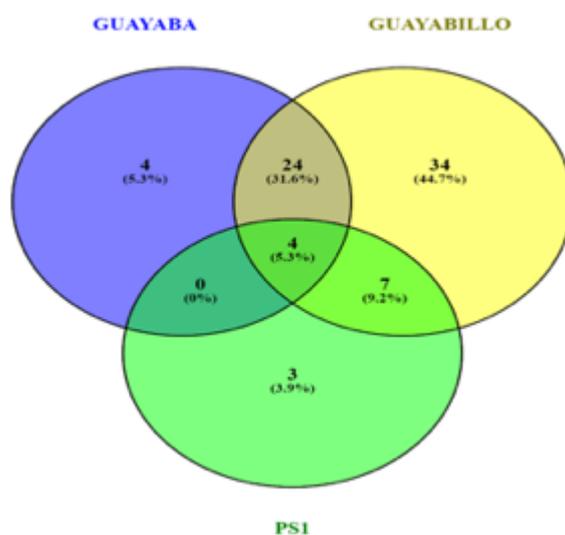
13. FIGURAS

Figura 1. Alelos compartidos entre *Psidium guajava* y *Psidium galapageium*, obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.



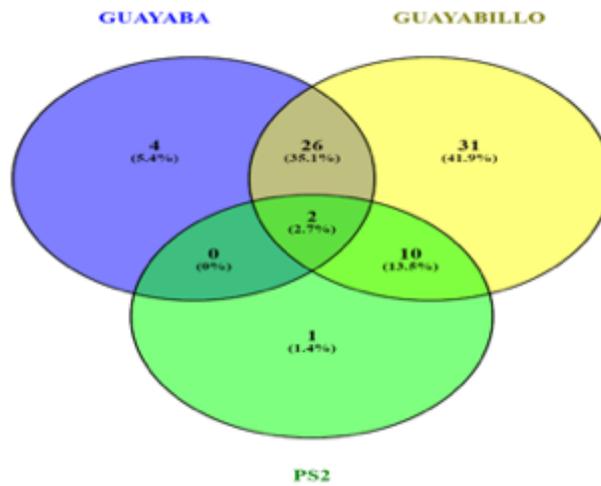
La presente figura representa en un diagrama de Venn, los alelos compartidos y exclusivos para guayabillo (*Psidium Galapageium*) y la guayaba (*Psidium guajava*)

Figura 2. Alelos compartidos entre *Psidium guajava*, *Psidium galapageium*, y *Psidium sp 1*, obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.



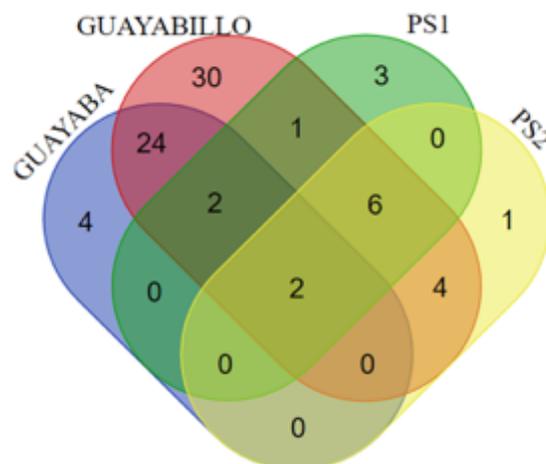
La presente figura representa en un diagrama de Venn, los alelos compartidos y exclusivos para el individuo *Psidium sp. 1*, guayabillo (*Psidium Galapageium*) y la guayaba (*Psidium guajava*)

Figura 3. Alelos compartidos entre *Psidium guajava*, *Psidium galapageium*, y *Psidium sp 2*, obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite.



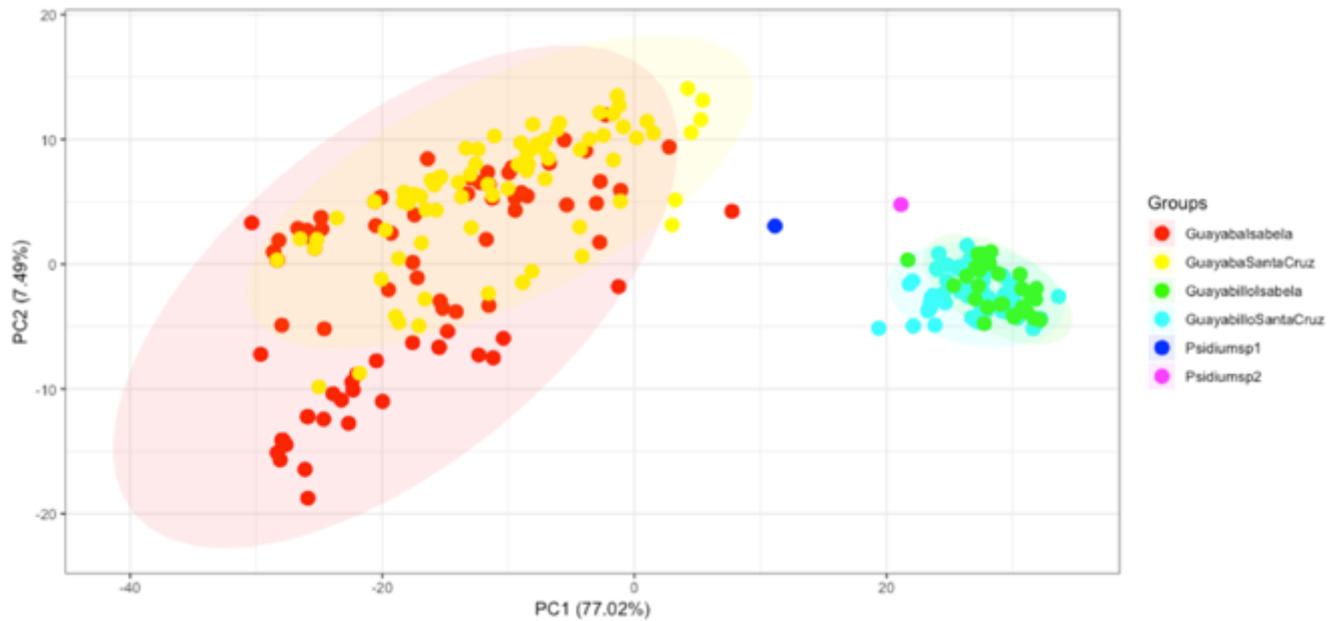
La presente figura representa en un diagrama de Venn, los alelos compartidos y exclusivos para el individuo *Psidium sp.2*, guayabillo (*Psidium Galapageium*) y la guayaba (*Psidium guajava*)

Figura 4. Alelos compartidos entre *Psidium guajava*, *Psidium galapageium*, *Psidium sp 1* y 2, obtenidos de regiones mPgCIR microsatélite



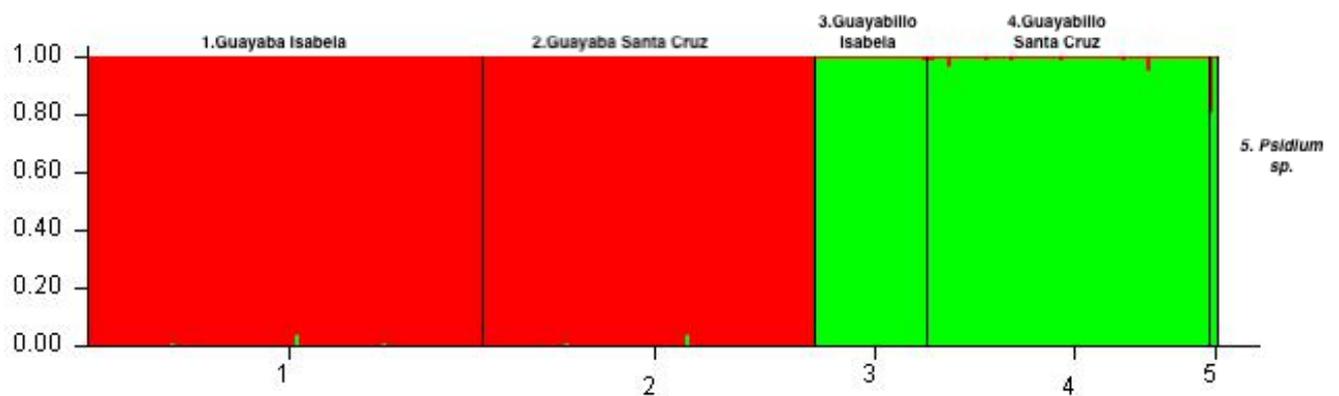
La presente figura representa en un diagrama de Venn, los alelos compartidos de todos los individuos analizados.

Figura 5. PCoA por individuo



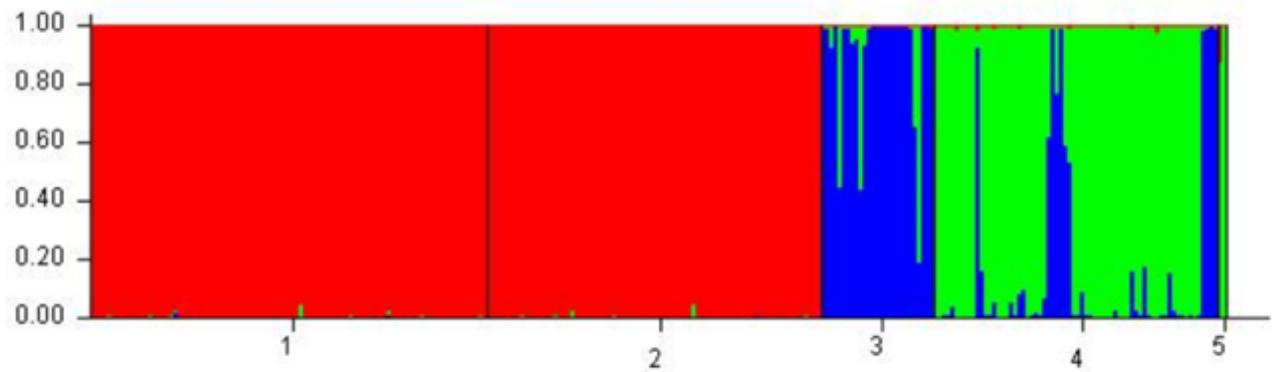
En la presente figura se observa como el individuo *Psidium sp. 1* esta entre los grupos de guayaba y guayabillo, estando más cercano a este primero. Mientras se evidencia que el individuo *Psidium sp. 2* se agrupa a la altura de los guayabillos.

Figura 6. Diagrama de estructura poblacional con K óptimo de 2



En la presente figura se identifican que uno de los individuos *Psidium sp* tiene una contribución mayoritariamente de guayabillo, aunque se evidencia una pequeña o moderada contribución de Guayaba.

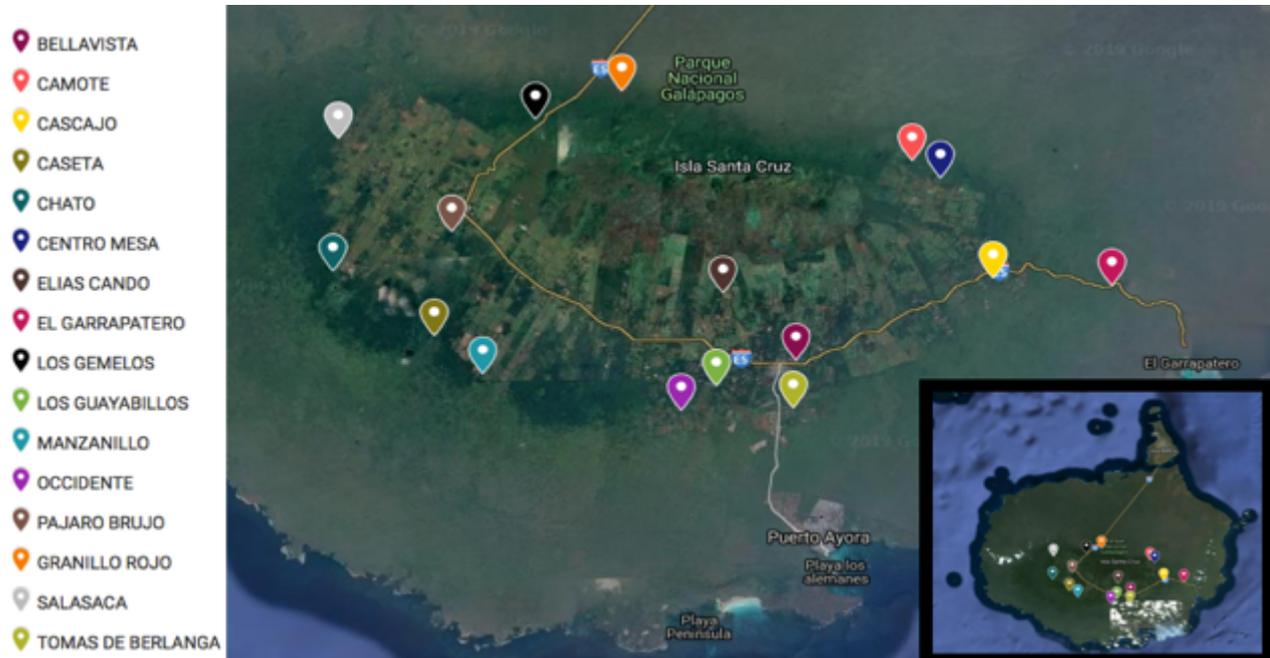
Figura 7. Diagrama de estructura poblacional con K de 3



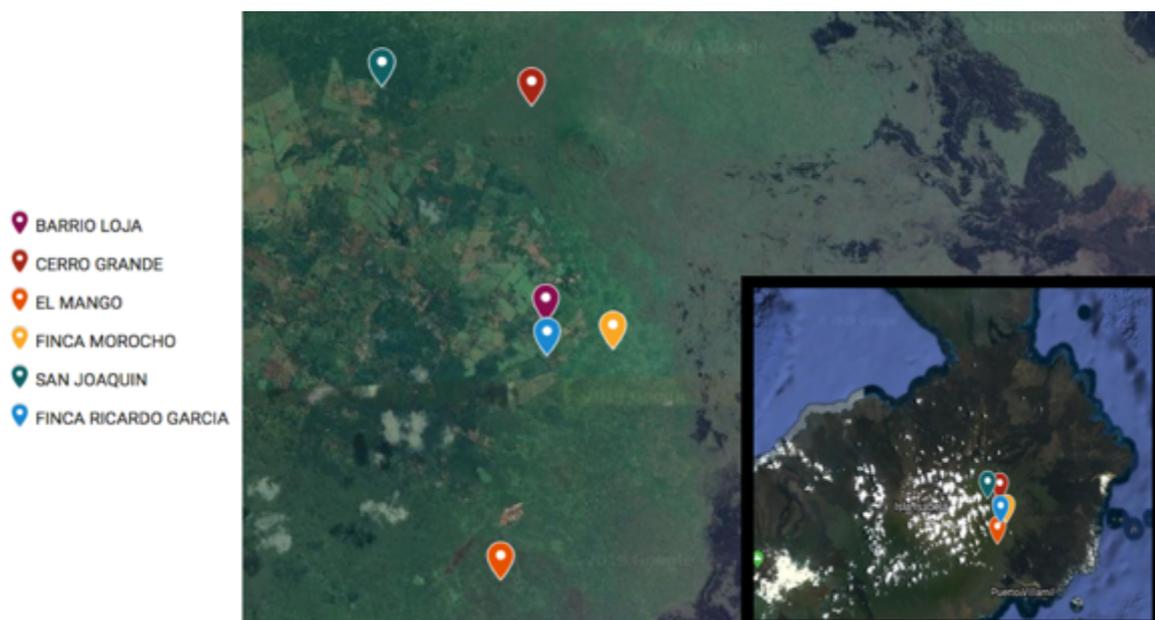
Este diagrama representa un K de 3, en el cual se identifican dos grupos que contribuyen a los individuos de guayabillo (azul y verde). Si bien este no es el mejor K, se quería evidenciar si existe algún tercer grupo donde se agrupen exclusivamente alguno de los individuos *Psidium sp.*

1. ANEXOS

14.1 Anexo 1. Mapa de localidades en la Isla Santa Cruz, en donde se recolectaron individuos *Psidium galapageium*



14.2 Anexo 2. Mapa de localidades en la Isla Isabela, en donde se recolectaron individuos *Psidium galapageium*



14.3 Anexo 3. Coordenadas, concentraciones de ADN e índices de calidad para las 66 muestras extraídas en la isla Santa Cruz.

Localidad	Muestra	Coordenadas	Concentración de ADN (ng/μl)	Coficiente 260/280	Coficiente 260/230
Bellavista	YBE1	S 00 41.634 W 090 19.280	45.3	1.41	0.81
	YBE2	S 00 41.594 W 090 19.216	70.9	1.56	1.43
	YBE3	S 00 41.688 W 090 19.162	36.4	1.75	2.19
	YBE4	S 00 41.558 W 090 19.037	19.5	1.65	2.12
	YBE5	S 00 41.407 W 090 18.974	77.7	1.49	0.88
Camote	YCAM1	S 00 38.264 W 090 17.508	17	1.64	3.57
	YCAM2	S 00 38.298 W 090 17.552	7.2	1.28	1.06
	YCAM3	S 00 38.327 W 090 17.627	70	1.46	0.91
	YCAM4	S 00 38.191 W 090 17.478	185.5	1.73	1.97
	YCAM5	S 00 38.279 W 090 17.448	27.1	1.63	1.82
Cascajo	YCAS1	S 00 40.251 W 090 16.279	386.2	1.26	0.57
	YCAS2	S 00 40.270 W 090 16.183	61.7	1.5	1.02
	YCAS3	S 00 40.216 W 090 16.211	34.3	1.14	1.49
	YCAS4	S 00 40.226 W 090 16.263	161.5	1.34	0.66
	YCAS5	S 00 40.301 W 090 16.263	86.7	1.59	1.13
Caseta	YKZ1	S 00 39.979 W 090 26.363	44.7	1.31	1.21
Chato	YCH1	S 00 40.118 W 090 26.341	64.9	1.58	1.39
	YCH2	S 00 40.118 W 090 26.341	34.1	1.43	1.56
	YCH3	S 00 40.336 W 090 26.280	42.3	1.74	1.82
	YCH4	S 00 40.295 W 090 26.237	85.9	1.35	1.87
	YCH5	S 00 38.534 W 090 17.137	7.6	1.27	0.58
Centro Mesa	YCM1	S 00 38.563 W 090 17.080	107.7	1.53	1.03
	YCM2	S 00 38.574 W 090 17.284	25	1.61	1.44
	YCM3	S 00 40.631 W 090 20.401	110.5	1.43	1.11
Elias Cando	YEC1	S 00 40.507 W 090 20.390	5.2	0.92	0.52
	YEC2	S 00 40.397 W 090 14.335	65.2	1.63	1.98
Garrapatero	YGAP1	S 00 40.617 W 090 14.053	14.7	1.64	0.77

	YGAP2	S 00 40.367 W 090 14.460	53.1	1.56	1.07
	YGAP3	S 00 40.398 W 090 14.537	61.5	1.49	1.2
	YGAP4	S 00 40.394 W 090 14.602	18	1.85	2.08
	YGAP5	S 00 37.486 W 090 23.027	29.7	1.82	1.6
Granillo Rojo	YGR1	S 00 37.558 W 090 23.092	8.1	1.67	0.49
	YGR2	S 00 37.547 W 090 23.123	8.2	1.86	1.14
	YGR3	S 00 37.568 W 090 23.257	13.2	1.79	1.73
	YGR4	S 00 37.466 W 090 23.159	35.6	1.48	0.93
	YGR5	S 00 37.120 W 090 21.984	33.5	1.75	1.26
Los Gemelos	YGE1	S 00 37.158 W 090 21.960	40.2	1.76	1.68
	YGE2	S 00 37.267 W 090 21.926	59.1	1.6	1.09
	YGE3	S 00 37.009 W 090 22.024	17	1.8	1.8
	YGE4	S 00 36.931 W 090 22.048	42.4	1.7	1.45
	YGE5	S 00 41.910 W 090 20.484	43.2	1.77	1.55
Los Guayabillos	YGUA1	S 00 41.891 W 090 20.436	153.7	0.84	0.8
	YGUA2	S 00 42.053 W 090 20.498	184.2	1.64	1.59
	YGUA3	S 00 42.174 W 090 20.596	69.5	1.6	1.35
	YGUA4	S 00 42.286 W 090 20.620	13.7	1.56	1.22
	YGUA5	S 00 41.227 W 090 24.810	63.5	1.6	1.47
Manzanillo	YMAN1	S 00 41.759 W 090 24.102	33.8	1.8	1.9
	YMAN2	S 00 41.780 W 090 24.045	4.5	1.86	1.22
	YMAN3	S 00 41.855 W 090 24.065	34.7	1.76	1.76
	YMAN4	S 00 41.907 W 090 24.118	77.8	1.76	1.82
	YMAN5	S 00 41.915 W 090 24.199	42.2	1.67	1.29
Occidente	YOCC1	S 00 42.526 W 090 21.422	42.5	1.75	2.13
	YOCC2	S 00 42.461 W 090 20.925	102.5	1.77	1.79
	YOCC3	S 00 42.465 W 090 21.038	20.6	1.81	1.96
	YOCC4	S 00 42.471 W 090 21.111	16.2	1.8	2.02
	YOCC5	S 00 42.485 W 090 21.366	30.8	1.75	1.65
Pájaro Brujo	YPB1	S 00 39.461 W 090 24.534	81.9	1.42	1.01
Salasaca	YSA1	S 00 37.957 W 090 26.149	39.4	1.41	1.35
	YSA2	S 00 37.916 W 090 26.188	34.5	1.82	1.36

	YSA3	S 00 37.899 W 090 26.261	30.4	1.83	2.24
	YSA4	S 00 38.010 W 090 26.333	10	1.75	1.93
	YSA5	S 00 37.876 W 090 26.246	4.5	2.16	1.36
Tomas de Berlanga	YTB1	S 00 42.394 W 090 19.304	19.9	1.51	0.86
	YTB2	S 00 42.387 W 090 19.234	11.6	1.77	1.51
	YTB3	S 00 42.433 W 090 19.324	15.6	1.58	0.76
	YTB4	S 00 42.559 W 090 19.218	19.5	1.82	2.16
	YTB5	S 00 42.525 W 090 19.100	31	1.66	1.17

14.4 Anexo 4. Coordenadas, concentraciones de ADN e índices de calidad para las 66 muestras extraídas en la isla Santa Cruz.

Localidad	Muestra	Coordenadas	Concentración de ADN (ng/μl)	Coficiente 260/280	Coficiente 260/230
Barrio Loja	YBL1	S 00 51.307 W 91 0.122	16.7	1.7	1.52
	YBL2	S 00 51.211 W 91 00.051	7.7	1.72	1.35
Cerro Grande	YCG1	S 00 49.496 W 91 00.241	30.5	1.36	0.36
	YCG2	S 00 49.495 W 91 00.243	33.1	1.75	1.57
	YCG3	S 00 49.510 W 91 00.216	7.6	1.44	0.95
	YCG4	S 00 49.506 W 91 00.215	46.4	1.66	1.34
	YCG5	S 00 49.516 W 91 00.177	3.9	1.78	2.09
El Mango	YMA1	S 00 52.475 W 91 0.410	63.9	1.67	1.2
	YMA2	S 00 52.598 W 91 0.492	28.4	1.72	1.11
	YMA3	S 00 53.135 W 91 0.430	5.2	1.74	0.76
	YMA4	S 00 53.153 W 91 0.394	22.6	1.5	0.83
	YMA5	S 00 53.182 W 91 0.333	6.5	1.65	0.88
Finca Morocho	YFM1	S 00 51.277 W 90 59.588	24.4	1.86	1.9
	YFM2	S 00 51.270 W 90 59.580	36.9	1.65	1.23
	YFM3	S 00 51.296 W 90 59.570	35.3	1.63	1.44
	YFM4	S 00 51.277 W 90 59.532	30.6	1.71	1.55
	YFM5	S 00 51.269 W 90 59.526	43.7	1.79	1.8

Finca Ricardo García	YRG1	S 00 51.290 W 91 00.076	32.3	1.83	2.23
	YRG2	S 00 51.331 W 91 00.060	32.8	1.83	1.97
	YRG3	S 00 51.332 W 91 00.060	25.5	1.77	0.93
	YRG4	S 00 51.350 W 91 00.027	35.3	1.63	1.29
	YRG5	S 00 51.313 W 91 00.034	30.5	1.71	1.9
San Joaquín	YSJ1	S 00 49.445 W 91 01.139	35.7	1.65	2.9
	YSJ2	S 00 49.164 W 91 01.371	24.2	1.7	1.17
	YSJ3	S 00 49.170 W 91 01.350	15.1	1.74	1.49
	YSJ4	S 00 49.179 W 91 01.349	17.7	1.6	0.92
	YSJ5	S 00 49.169 W 91 01.388	2.5	1.29	0.91

14.5 Anexo 5. Matriz de alelos identificados en la región mPgCIR de individuos

P.galapageium en las Islas Santa Cruz e Isabela

Individuo	Isla	Localidad	Alelos identificados para cada primer mPgCIR									
			CIR05	CIR07	CIR08	CIR09	CIR10	CIR11	CIR13	CIR17	CIR18	CIR21
YBE1	Santa Cruz	Bellavista	176/176	134/180	192/234	186/206	270/270	314/318	253/253	204/234	192/200	150/168
YBE2	Santa Cruz		176/176	134/180	192/234	186/206	270/270	314/324	263/263	204/258	192/200	150/168
YBE3	Santa Cruz		174/216	134/180	192/234	186/206	270/270	320/328	263/263	200/240	174/174	170/192
YBE4	Santa Cruz		176/176	134/180	192/234	186/206	270/270	314/318	263/263	204/260	174/174	150/170
YBE5	Santa Cruz		174/216	134/134	192/234	206/206	270/270	320/328	NA	NA	190/216	170/192
YCAM1	Santa Cruz	Camote	176/216	134/166	194/236	178/178	270/270	314/320	263/263	204/258	190/200	150/168
YCAM2	Santa Cruz		174/174	134/134	232/232	182/182	270/270	314/320	239/239	204/258	190/200	150/180
YCAM3	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	176/180	270/270	314/320	261/261	204/258	190/200	150/168
YCAM4	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	184/186	270/270	314/320	263/263	204/258	190/200	150/168
YCAM5	Santa Cruz		176/176	134/166	194/236	176/176	270/270	314/320	263/263	204/258	190/200	160/180
YCAS1	Santa Cruz	Cascajo	176/216	134/166	194/236	178/178	270/270	318/324	239/239	190/190	188/198	160/178
YCAS2	Santa Cruz		176/216	NA	194/236	170/180	270/270	318/324	263/263	190/208	188/198	150/168
YCAS3	Santa Cruz		176/176	134/166	236/236	170/180	270/270	314/322	263/263	208/254	188/198	160/186
YCAS4	Santa Cruz		176/176	134/166	148/150	170/180	270/270	318/324	263/263	204/258	188/192	152/160
YCAS5	Santa Cruz		176/176	NA	148/150	178/178	270/270	314/320	263/263	190/252	190/200	160/178
YKZ1	Santa Cruz	Caseta	176/176	132/134	148/194	170/182	270/280	318/322	251/257	204/254	186/192	188/200
YCH1	Santa Cruz	Chato	176/176	134/180	194/236	170/182	270/270	314/322	257/257	210/254	188/194	160/178
YCH2	Santa Cruz		176/176	134/164	194/236	170/182	270/270	314/322	257/257	204/254	188/194	160/178
YCH3	Santa Cruz		176/216	134/182	194/236	NA	270/270	314/322	239/239	250/250	192/202	168/168
YCH4	Santa Cruz		176/176	134/134	NA	186/206	270/270	316/324	239/239	208/254	-9/194	160/178

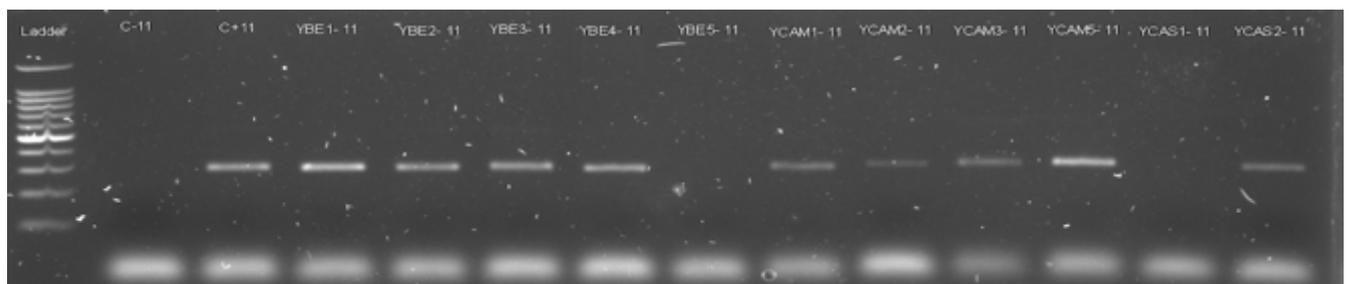
YCH5	Santa Cruz		176/176	134/134	236/236	186/206	270/270	314/324	239/239	190/252	188/194	160/166
YCM1	Santa Cruz	Centro Mesa	176/216	134/134	194/236	186/206	270/270	314/324	239/239	208/252	190/200	160/178
YCM2	Santa Cruz		176/220	134/134	194/236	168/168	270/270	314/320	257/257	204/258	190/200	160/178
YCM3	Santa Cruz		176/176	134/134	236/236	206/206	162/270	314/320	251/251	210/252	188/194	160/178
YEC1	Santa Cruz	Elias Cando	176/176	134/134	148/150	186/206	250/274	318/322	251/251	254/254	186/200	160/178
YEC2	Santa Cruz		176/220	134/134	148/150	206/206	258/270	314/320	269/269	254/258	190/198	150/168
YGAP1	Santa Cruz	Garrapatero	176/216	134/174	194/236	186/206	162/270	318/322	239/239	204/258	188/198	160/180
YGAP2	Santa Cruz		204/238	134/134	194/194	182/206	270/270	318/332	239/239	190/258	188/188	160/184
YGAP3	Santa Cruz		174/216	134/180	236/236	186/206	270/270	318/332	239/239	190/252	190/198	160/182
YGAP4	Santa Cruz		174/216	134/184	236/236	186/206	270/270	318/332	239/239	204/258	190/198	160/182
YGAP5	Santa Cruz		174/216	134/134	194/194	186/206	256/270	318/332	NA	190/252	190/198	160/180
YGR1	Santa Cruz	Granillo Rojo	176/216	156/156	236/236	182/206	180/270	314/328	239/239	190/252	NA	160/178
YGR2	Santa Cruz		176/216	156/156	194/236	182/206	270/270	318/322	239/239	190/252	192/202	160/180
YGR3	Santa Cruz		176/176	134/156	236/236	186/206	270/270	314/324	239/239	186/250	176/188	180/180
YGR4	Santa Cruz		176/216	136/176	194/236	186/206	270/270	314/324	239/239	214/254	NA	150/158
YGR5	Santa Cruz		176/216	134/156	194/236	182/206	270/270	318/322	239/239	190/252	176/192	150/158
YGE1	Santa Cruz	Los Gemelos	176/216	134/156	148/194	182/206	270/270	314/324	263/263	204/250	188/194	160/180
YGE2	Santa Cruz		176/176	134/174	148/194	182/206	256/270	314/324	269/269	204/204	188/194	160/178
YGE3	Santa Cruz		176/176	134/134	148/194	178/206	270/270	314/324	263/263	208/252	188/194	156/176
YGE4	Santa Cruz		176/176	134/134	148/194	180/206	270/270	314/324	263/263	216/258	188/194	160/180
YGE5	Santa Cruz		176/176	134/134	148/194	180/206	270/270	314/324	263/263	216/258	188/194	160/178
HBGe1	Santa Cruz		208/220	158/162	234/234	NA	286/364	328/328	227/231	240/256	192/226	136/166
YGUA1	Santa Cruz	Los Guayabillos	176/224	176/176	150/236	180/206	270/270	314/324	239/239	204/258	186/200	160/178
YGUA2	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	180/206	268/268	314/322	251/251	204/258	190/200	160/178
YGUA3	Santa Cruz		176/176	176/176	194/236	180/206	270/270	314/320	239/239	204/258	190/200	160/178
YGUA4	Santa Cruz		176/176	176/176	194/236	180/186	270/270	314/320	239/239	208/254	188/194	160/178
YGUA5	Santa Cruz		176/176	134/134	148/150	180/206	270/270	318/322	251/251	208/252	188/194	160/180
YMAN1	Santa Cruz	Manzanillo	176/216	134/156	194/236	178/206	270/270	314/324	239/239	250/250	192/202	152/192
YMAN2	Santa Cruz		176/214	134/156	194/236	180/206	270/270	316/324	269/269	260/260	188/194	164/180
YMAN3	Santa Cruz		176/214	134/156	194/236	186/206	270/270	314/324	251/251	204/254	188/194	162/186
YMAN4	Santa Cruz		176/176	134/156	194/236	186/206	268/268	314/322	261/261	190/250	188/194	160/178
YMAN5	Santa Cruz		176/176	NA	194/236	182/206	270/270	316/324	263/263	204/252	188/194	160/178
YOCC1	Santa Cruz	Occidente	176/176	134/134	194/236	170/180	256/270	314/322	251/251	208/254	188/194	160/180
YOCC2	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	170/178	270/280	314/320	263/263	208/256	190/200	150/166
YOCC3	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	170/178	268/268	314/322	237/237	208/256	188/194	160/178
YOCC4	Santa Cruz		176/176	134/134	194/236	170/178	268/268	314/322	251/251	212/254	188/194	160/180
YOCC5	Santa Cruz		176/216	134/134	194/236	170/178	268/268	314/322	237/237	NA	192/202	150/184
YPB1	Santa Cruz	Pajaro Brujo	176/216	142/180	258/258	206/206	270/270	314/322	239/239	240/252	192/202	160/180
YSA1	Santa Cruz	Salasaca	176/176	132/156	194/236	186/206	268/268	316/322	237/237	212/254	188/194	160/186
YSA2	Santa Cruz		176/176	132/132	194/236	186/206	268/268	316/322	263/263	214/254	188/194	160/178
YSA3	Santa Cruz		176/176	132/166	194/236	186/206	270/310	316/322	263/263	208/254	188/194	160/182
YSA4	Santa Cruz		176/176	132/156	194/236	186/206	256/270	316/322	263/263	214/258	188/194	160/182

YSA5	Santa Cruz		176/176	132/156	194/236	182/206	270/270	316/322	NA	208/254	188/194	160/184
Psp_SCZ_02	Santa Cruz	Santa Rosa	208/220	158/162	NA	182/182	272/272	326/326	227/231	240/256	192/224	134/136
YTB1	Santa Cruz	Tomas de Berlanga	176/176	134/134	236/236	206/206	270/270	314/322	235/235	208/254	186/194	172/184
YTB2	Santa Cruz		176/216	134/134	NA	206/206	268/268	318/326	263/263	190/260	190/192	172/184
YTB3	Santa Cruz		176/216	134/180	194/236	206/206	270/270	318/326	257/257	190/260	190/192	160/178
YTB4	Santa Cruz		176/216	134/180	194/236	206/206	268/268	318/332	237/237	190/260	190/198	170/184
YTB5	Santa Cruz		176/216	134/180	236/236	206/206	270/270	318/326	NA	190/260	190/192	160/178
YBL1	Isabela	Barrio Loja	176/216	134/156	194/236	186/206	180/270	324/332	239/239	190/190	188/198	160/178
YBL2	Isabela		176/216	134/156	194/236	206/206	160/268	324/332	337/257	190/190	188/198	160/178
YCG1	Isabela	Cerro Grande	176/216	134/134	194/236	176/206	268/268	318/322	237/237	260/260	198/210	160/178
YCG2	Isabela		176/216	134/134	194/236	186/206	268/268	324/332	237/261	190/190	188/198	160/178
YCG3	Isabela		176/176	NA	236/236	186/206	270/270	314/320	237/237	260/260	188/198	160/178
YCG4	Isabela		176/216	134/134	236/236	170/206	268/268	318/332	239/239	260/260	188/198	160/170
YCG5	Isabela		176/216	134/134	236/236	170/206	268/268	324/332	261/261	190/190	188/198	154/180
YMA1	Isabela	El Mango	176/216	134/134	148/150	178/206	266/266	314/324	251/251	190/190	190/198	160/178
YMA2	Isabela		176/216	132/132	148/150	170/206	268/268	324/332	237/237	190/190	190/198	160/178
YMA3	Isabela		176/176	134/134	148/150	180/182	270/270	310/328	251/251	190/190	190/198	160/178
YMA4	Isabela		176/216	134/134	148/150	178/182	250/270	324/332	251/251	190/190	190/198	160/178
YMA5	Isabela		176/216	134/134	194/236	206/206	256/270	324/332	251/251	190/190	186/198	154/182
YFM1	Isabela	Finca Morocho	176/216	134/134	194/236	186/206	178/268	324/332	237/237	196/238	190/198	160/178
YFM2	Isabela		176/216	134/182	194/236	186/206	270/270	324/332	237/237	196/238	190/198	160/178
YFM3	Isabela		176/216	134/134	194/236	186/206	268/268	318/332	237/237	196/238	198/202	160/178
YFM4	Isabela		176/216	134/134	194/236	186/206	180/268	318/332	239/239	196/238	198/202	160/178
YFM5	Isabela		176/216	134/182	194/236	186/206	270/270	324/332	237/237	190/190	190/198	160/178
YRG1	Isabela	Finca Ricardo García	176/216	134/180	194/236	186/206	256/270	324/332	251/251	190/190	190/198	160/178
YRG2	Isabela		176/216	134/182	194/236	186/206	270/270	324/332	237/251	190/190	190/198	154/178
YRG3	Isabela		176/216	134/190	194/236	186/206	256/270	318/332	251/257	190/252	198/202	152/178
YRG4	Isabela		176/216	134/190	194/236	186/206	256/270	326/332	257/257	190/190	190/198	154/178
YRG5	Isabela		176/216	134/134	194/236	186/206	268/268	324/332	251/251	190/190	190/198	154/192
YSJ1	Isabela	San Joaquín	176/176	134/134	194/236	206/206	256/268	318/326	251/257	190/252	188/200	162/174
YSJ2	Isabela		176/176	134/190	194/236	206/206	268/268	318/326	239/239	212/234	188/200	164/176
YSJ3	Isabela		176/216	134/134	194/236	206/206	256/268	318/332	237/251	236/262	198/202	152/160
YSJ4	Isabela		176/216	134/190	194/236	206/206	270/270	324/332	237/251	190/236	190/198	154/180
YSJ5	Isabela		176/216	156/156	194/236	206/206	268/268	318/332	239/239	190/236	198/202	152/178

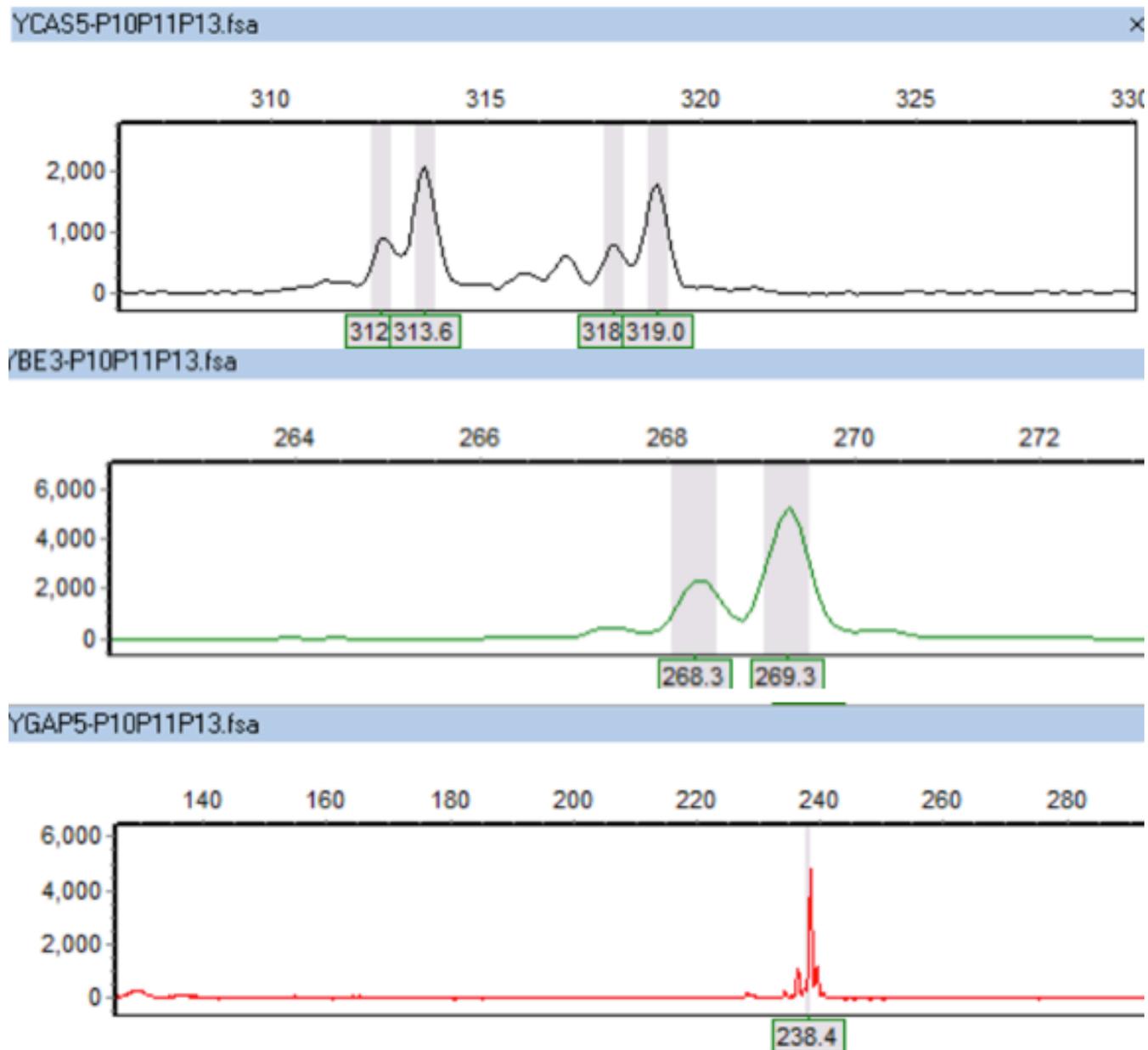
14.6 Anexo 6. Matriz de frecuencias alélicas para dos alelos en los diferentes grupos propuestos para el software NewHybrids

Grupo Parental 1	1	0	0	0
Grupo Parental 2	0	0	0	1
F1	0	0.5	0.5	0
F2	0.25	0.25	0.25	0.25
Retrocruce con Parental 1	0.5	0.25	0.25	0
Retrocruce con Parental 2	0	0.25	0.25	0.5

14.7 Anexo 7. Ejemplos de geles de electroforésis de producto de PCR con primers mPgCIR18 (arriba) y mPgCIR11 (abajo)



14.8 Anexo 8 Ejemplos de electroferogramas obtenidos a partir del genotipado por electroforesis capilar en Macrogen Corea



14.9 Anexo 9 Árbol de *Psidium galapageium* (izquierda), creciendo junto a un árbol de *Psidium guajava* (derecha).



Fotografía: Hugo Valdebenito

14.10 Anexo 10. Árboles de *Psidium galapageium* en la localidad Los Gemelos, en la isla Santa Cruz.



Fotografías: Ricardo Campoverde