

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (*Vaccinium floribundum*
Kunth.) en tres Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura,
Pichincha y Cotopaxi.**

MARÍA MERCEDES COBO ANDRADE

María de Lourdes Torres, PhD, Directora de Tesis

Tesis de grado presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Procesos Biotecnológicos

Quito, junio de 2014

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Estudio de Diversidad Genética de Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth.) en tres
Provincias de la Sierra Ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi.

María Mercedes Cobo Andrade

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Director de la tesis y Miembro de Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Carlos Valle, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias Biológicas
y Ambientales

Quito, junio de 2014

© DERECHOS DE AUTOR

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

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

Firma:

Nombre: María Mercedes Cobo Andrade

C. I.: 1003268412

Fecha:

Dedicatoria

Dedico este trabajo a mi mamá y a mi hermana por todo su apoyo durante mi carrera universitaria y en cada paso de mi vida. Son mi alegría y mi mayor fuerza, este logro es suyo.

Agradecimientos

Quiero agradecer en primer lugar a Dios, por su amor infinito y por darme la salud y vida para alcanzar esta meta. También agradezco a mi familia por su apoyo incondicional; a mi mami por ser un ejemplo de amor y humildad, a mi hermana por ser mi mejor amiga, por toda la paciencia y entrega a lo largo de mi vida universitaria. Espero poder algún día recompensar todo lo que hacen por mí.

Además, quiero agradecer a María de Lourdes Torres por darme la oportunidad de realizar mi proyecto final en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, por su valiosa guía y por todo lo que me ha enseñado. A Venancio, Carlos y Rodrigo por sus consejos y ayuda siempre oportuna. Han sido una parte fundamental para la culminación de este proyecto.

Finalmente y no menos importante, quiero agradecer a Bernardo por la paciencia y apoyo de principio a fin, y a todos mis amigos que me han acompañado durante la realización de este proyecto en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal y a lo largo de mi carrera universitaria. Vivi, Cris, Estefi, Jo, Jenni, Jou, Gaby, Fer, Milton, Andy, Cubo, Geovy, Gigi. Mil gracias por las enseñanzas, consejos, risas y abrazos compartidos, son una gran bendición en mi vida.

Resumen

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una especie nativa de las regiones andinas, que se encuentra en alturas entre los 1800 y 3800 msnm. Crece en forma de arbusto y su fruto es una baya azul oscura y de sabor astringente. Se han reportado propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de su fruto, por lo que es una especie que tiene un gran potencial farmacológico. En Ecuador el mortiño crece de forma silvestre y los frutos son colectados estacionalmente para su uso principalmente en la gastronomía local. La presente investigación tuvo como objetivo caracterizar la diversidad genética de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) proveniente de 9 localidades en los páramos de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi, mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites. Se analizó en total 126 muestras de mortiño con el uso de 11 pares de primers heterólogos. Se identificó 63 alelos en los 11 loci, un promedio de 4,46 alelos por cada uno. Los indicadores de diversidad genética analizados (heterocigocidad esperada, índice de Shannon, índice de fijación) muestran una alta diversidad genética para las tres provincias en estudio. El análisis de variación molecular muestra que el 85% de la diversidad genética corresponde a la variabilidad intrapoblacional y 14% corresponde a la variabilidad interpoblacional. Esto fue consistente con las distancias genéticas de Nei y de Wright que no presentan diferencias genéticas significativas entre las 9 localidades analizadas. Adicionalmente, con los datos encontrados se estimó la estructura poblacional de mortiño mediante inferencia bayesiana. Los resultados muestran dos posibles modelos de estructura poblacional, uno con presencia de 2 subpoblaciones y otro con presencia de 3 subpoblaciones. Se requiere ampliar la investigación para concluir sobre la estructura poblacional del mortiño.

Este estudio representa un primer acercamiento para conocer la diversidad genética y la estructura poblacional del mortiño en Ecuador, información que puede ser utilizada para la conservación de este importante recurso biológico y para su manejo adecuado.

Abstract

Mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) is a species native to the Andean region, found at altitudes between 1800 and 3800 msnm. It grows as a shrub and its fruit is a dark blue berry with a stringent flavor. Its antioxidant and antiinflammatory properties make it a species with great pharmacological potential. In Ecuador, mortiño grows as in the wild and its fruits are collected seasonally for use mainly in the local cuisine. The aim of this study was to characterize the genetic diversity for mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) in 9 sites from the provinces of Imbabura, Pichincha and Cotopaxi, using microsatellite molecular markers. A total of 126 samples were analyzed using 11 heterologous primers. A number of 63 alleles were identified in the 11 loci analyzed, an average of 4.46 alleles per locus. Genetic diversity indicators, such as expected heterozygosity, Shannon index and fixation index, show high genetic diversity for the three provinces under study. The molecular variance analysis performed shows that 85% of the genetic variability was found within populations and 14% was found between populations. This was consistent with Nei and Wright genetic distances, where no significant genetic differences between 9 locations were found. Additionally, population structure was inferred through Bayesian inference. The results show two potential population structure models, with the presence of 2 and 3 subpopulations respectively. A broader investigation is required to obtain conclusive results regarding the mortiño population structure.

This study represents a first approach for the determination of genetic diversity and population structure of mortiño in Ecuador, and provides the basis for the conservation of this important biological resource and for its adequate management.

Tabla de Contenidos

1. Introducción	1
1.1 Género <i>Vaccinium</i>	1
1.1.1 Origen y Distribución	1
1.1.2 Taxonomía del género	2
1.1.3 Importancia Económica	3
1.2 <i>Vaccinium floribundum</i> Kunth. Mortiño.....	3
1.2.1 Generalidades y Distribución	3
1.2.2 Propiedades fitoquímicas	5
1.3 Diversidad genética.....	6
1.4 Marcadores Moleculares	7
1.4.1 Microsatélites.....	8
1.4.2 Aplicaciones de los microsatélites	9
1.4.3 Estudios genéticos en el género <i>Vaccinium</i> con el uso de marcadores moleculares	10
2. Objetivos.....	11
2.1 Objetivo General	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. Área de Estudio.....	12
4. Justificación.....	13

5. Materiales	14
5.1 Colección de muestras de mortiño	14
5.2 Extracción de ADN a partir de hojas de mortiño	14
5.3 Cuantificación de ADN de mortiño	15
5.4 Electroforesis en geles de agarosa.....	15
5.5 Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR	15
5.6 Electroforesis en geles de acrilamida	16
5.7 Tinción de Plata.....	17
5.8 Fotografía de geles	17
6. Métodos.....	17
6.1 Obtención del material vegetal.....	17
6.2 Extracción y cuantificación de ADN de mortiño	18
6.3 Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites.....	19
6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.	20
6.5 Toma de datos y elaboración de matrices alélicas	22
6.6 Análisis de diversidad genética de mortiño	22
6.7 Estimación de la estructura poblacional de mortiño	23
7. Resultados.....	24
7.1 Colección de muestras de mortiño, extracción y cuantificación de ADN	24
7.2 Amplificación de regiones microsatélites con primers heterólogos	25
7.3 Diversidad alélica de mortiño	25

7.4	Diversidad genética de mortiño	25
7.4.1	Diversidad genética intrapoblacional.....	26
7.4.2	Diversidad genética interpoblacional.....	26
7.5	Estructura poblacional.....	28
8.	Discusión.....	30
8.1	Colección de muestras de mortiño y extracción de ADN	30
8.2	Amplificación de regiones microsátélites con primers heterólogos.	30
8.3	Diversidad alélica de mortiño	31
8.4	Diversidad genética de mortiño	32
8.5	Estructura Poblacional	34
9.	Conclusiones	40
10.	Recomendaciones	41
11.	Referencias	43
12.	Tablas.....	51
13.	Figuras	57
14.	Anexos	64

TABLAS

Tabla 1. Resumen de la información proporcionada por los 11 marcadores tipo microsatélites analizados: temperatura de annealing, número y rango de tamaño de los alelos encontrados en 126 muestras de mortiño procedentes de la sierra ecuatoriana. ...	51
Tabla 2. Resumen de datos de colección de muestras de mortiño, extracción de ADN y número de alelos encontrados en los 11 loci analizados	52
Tabla 3. Resumen de parámetros de diversidad genética de mortiño obtenidos para cada localidad con el uso de GenAEx 6.501. (Promedio \pm desviación estándar)	52
Tabla 4. Resumen de parámetros de diversidad genética de mortiño obtenidos con el uso de GenAEx 6.501. (Promedio \pm desviación estándar)	53
Tabla 5. Matriz de distancias genéticas de Nei entre individuos de mortiño provenientes de las 9 localidades muestreadas	53
Tabla 6. Matriz de distancias genéticas de Wright (<i>F_{st}</i>) entre individuos de mortiño provenientes de las 9 localidades muestreadas.	54
Tabla 7. Valores para estimación de la K óptima (método Evano <i>et al.</i> , 2005) a partir del análisis en Structure con información previa de localidad y provincia de origen de las muestras de mortiño.	55
Tabla 8. Valores para estimación de la K óptima (método Evano <i>et al.</i> , 2005) a partir del análisis en Structure con información previa de localidad y región geográfica de origen de las muestras de mortiño.	56

FIGURAS

- Figura 1.** Mapa del Ecuador donde se observa las Provincias en estudio (Imbabura, Pichincha y Cotopaxi) y los sitios de colección de muestras de mortiño dentro de cada provincia.57
- Figura 2.** Electroforesis en gel agarosa al 1.5% de muestras de ADN extraído a partir de hojas de mortiño de Cotopaxi. Se observa ADN de alto peso molecular en todas las muestras (C001-C013). Ladder: marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).58
- Figura 3.** Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 16 muestras de ADN de mortiño usando el primer CA794F. Se observa 5 alelos en las muestras analizadas (A-E). El ladder utilizado es 10bp de Invitrogen y los alelos se encuentran en un rango entre 224 y 255 pares de bases.58
- Figura 4.** Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 17 muestras de ADN de mortiño usando el primer NA800. Se observa 6 alelos en las muestras analizadas (A-F). El ladder utilizado es 10bp de Invitrogen y los alelos se encuentran en un rango entre 196 y 216 pares de bases.58
- Figura 5.** Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) representada en función de la distribución de la diversidad genética de mortiño entre provincias, entre poblaciones y dentro de las poblaciones. Variación entre provincias indica la variabilidad genética encontrada al comparar individuos de mortiño de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos de mortiño entre las 9 localidades muestreadas. La variación dentro de las poblaciones indica la diferenciación genética de los individuos de mortiño dentro de cada una de las 9 poblaciones en estudio, es decir, entre los individuos.59

Figura 6. Dendrograma obtenido mediante el método Neighbor Joining con las 126 muestras de mortiño de tres provincias de la sierra ecuatoriana. Se observa en color verde los individuos de Imbabura, en color azul los individuos de Pichincha y en color naranja los individuos de Cotopaxi. Se observa 6 grupos separados, 4 de éstos con individuos mezclados de todas las localidades. Un grupo tiene individuos solo de la provincia de Imbabura (grupo 4) y un subgrupo del grupo 1 separa a todos los individuos de Quilotoa.....60

Figura 8. Gráfico de dispersión para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de cada par de individuos de mortiño de la muestra en estudio, mediante una prueba de Mantel pareada. rxy: coeficiente de correlación. P: significancia.....62

Figura 9. Gráfico de asignación de ancestro para los individuos de mortiño de 9 localidades en tres provincias de la sierra ecuatoriana. a. Resultado del análisis que incluye localidad y provincia como información previa, obteniendo un valor óptimo de $K=2$. b. Resultado del análisis que incluye localidad y región geográfica como información previa, obteniendo un valor óptimo de $K=3$62

Figura 10. Mapa georeferenciado de las tres provincias y las 9 localidades de la sierra ecuatoriana que se analizan en este estudio. Los marcadores de color amarillo representan la primera región geográfica tomada para el análisis con Structure en base a la ubicación geográfica. Incluyen Cotacachi-Cayapas, San Pablo, Cashaloma y Mojanda. Los marcadores de color rojo corresponden a la segunda región geográfica, conformado por las localidades de Parque Nacional Cotopaxi Norte, Parque Nacional Cotopaxi Sur e Ilinizas. La tercera región geográfica con los marcadores de color verde incluyen las localidades de Sigchos y Quilotoa.....63

ANEXOS

Anexo I. Muestras de hojas de mortiño colectadas en Imbabura, Pichincha y Cotopaxi.

Se indica la localidad, el código de la muestra, las coordenadas geográficas y la altitud de los sitios de colección.64

1. Introducción

1.1 Género *Vaccinium*

1.1.1 Origen y Distribución

El género *Vaccinium* tiene su origen en distintas regiones alrededor del mundo. El Sudeste asiático es el centro de origen del 40% de las especies de *Vaccinium*. Aproximadamente el 35% de especies son nativas de América, 25% de Norte América y 10% de América Central y América del Sur. El 25% restante provienen de diferentes zonas alrededor del mundo (Luby *et al.*, 1991). El género *Vaccinium* está conformado por arbustos terrestres dentro de la familia de las Ericaceas, subfamilia Vaccinioideae (Vander Kloet 1998). Contiene aproximadamente 450 especies distribuidas ampliamente en el Hemisferio Norte, así como también en las montañas de las zonas tropicales de Asia, de América Central y de América del Sur. Se han reportado pocas especies en África y Madagascar y 92 especies (51 endémicas) en China (Luby *et al.*, 1991). Se encuentra alta densidad de especies de *Vaccinium* distribuidas en los Himalayas, Nueva Guinea y en la región andina de Sudamérica (Luby *et al.*, 1991; Hancock *et al.*, 2008) *V. uliginosum* L. es la especie con mayor distribución mundial. Muchas de las especies de *Vaccinium* son de uso ornamental por sus coloridas hojas, flores y frutos (Galletta y Ballington 1996).

En el siglo veinte, tres especies principales del género *Vaccinium* han sido domesticados (mora azul o blueberry, arándano o cranberry y lingonberry) (Lyrene *et al.*, 2003). La mayor parte de la producción comercial proviene de especies de la sección *Cyanococcus* donde se incluyen cultivares de *Vaccinium corybosum* L. (*highbush blueberry*), *Vaccinium ashei* Reade, *Vaccinium virgatum* y *Vaccinium*

agustifolium. Este tipo de blueberry de arbustos altos se separa en dos tipos: del norte y del sur de acuerdo a los requerimientos de frío y de la resistencia al invierno (Kole, 2011). *Vaccinium macrocarpon* (large cranberry) dentro de la sección *Oxycoccus*, es una especie domesticada de importancia. Dentro de la sección *Myrtillus* hay especies silvestres como *Vaccinium myrtillus* L (bilberry, whortleberry), *Vaccinium ovalifolium* Sm (huckleberry) y *Vaccinium deliciosum* Piper (cascade bilberry). Dentro de la sección *Vitis-Idadea* se encuentra *Vaccinium vitis-idaea* (lingonberry).

Otras secciones del género *Vaccinium* que han cobrado importancia en los últimos años incluyen la sección *Vaccinium* con especies como *V. uliginosum* L. Esta es una de las especies árticas que ocurre en las regiones frías del hemisferio norte, en las altas altitudes al sur de los Pirineos, los Alpes, el Cáucaso, las montañas de Mongolia, en el norte de China y el centro de Japón en Asia, y en las Montañas Rocosas en Utah en América del Norte (Luby *et al.*, 1991). Esta especie crece en suelos ácidos húmedos en los brezales, los páramos, la tundra, y en el sotobosque de los bosques de coníferas, desde el nivel del mar en el Ártico hasta 3400 m de altitud (Young, 1970). Las bayas comestibles provenientes de plantas silvestres se utilizan generalmente para mermelada, jugo, pastel, jalea, y la elaboración del vino (Iwagaki *et al.*, 1977). En la Sección *Pyxothamnus* al menos tres especies producen frutas en forma de baya comestible. Una de estas es *Vaccinium floribundum* Kunth (mortiño) que se distribuye en Costa Rica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú (Luby *et al.*, 1991; Finn, 1999).

1.1.2 Taxonomía del género

El género *Vaccinium* al ser un género tan grande, es taxonómicamente complejo. Sleumer en 1941 dividió el género en 33 secciones basadas en la filogenética a partir de características morfológicas. Sin embargo, la composición de las especies de

cada sección y las relaciones evolutivas han sido objeto de mucho debate (Powell y Kron 2002). Además, muchos de los indicadores utilizados tradicionalmente para delimitar géneros (flores, frutos, semillas y partes vegetativas) no distinguen adecuadamente entre taxones (Kron *et al.*, 2002). Centenares de especies del género *Vaccinium* que son nativas de las zonas altas tropicales son poco conocidas, aunque muchas tienen un gran potencial como plantas ornamentales o para el aprovechamiento de su fruta.

1.1.3 Importancia Económica

Los frutos del género *Vaccinium* son de importancia económica ya que son percibidos por el público como un alimento que promueve la salud. Según un informe del ARS (*Agricultural Research Service*) del USDA (*United States Department of Agriculture*), los blueberries y cranberries se encuentran en las posiciones 1 y 2 en cuanto a contenido de antioxidantes en un reporte que incluye 19 frutas comunes. Es probable que la demanda de las bayas de las diversas especies de *Vaccinium* continúe creciendo debido a sus propiedades nutricionales y terapéuticas (Kole, 2011).

1.2 *Vaccinium floribundum* Kunth. Mortiño

1.2.1 Generalidades y Distribución

El mortiño, conocido también como *macha-macha* en Bolivia, *congama* en Perú y *chivacu* en Venezuela, es un arbusto pequeño. Algunos especímenes crecen hasta 2m o 3m de altura, mientras otros son individuos enanos y postrados. Su apariencia ha sido considerada como un arbusto ornamental, gracias a sus flores rosadas y su follaje verde profundo. Sus frutos son bayas redondas de hasta 8mm de diámetro, de color azul hasta casi negro, con una apariencia glauca gracias a la cobertura con una sustancia blanca y polvosa sobre los frutos (similar a las uvas, *Vitis spp.*). Es una especie que se reproduce

de forma vegetativa por medio de rizomas y de forma sexual principalmente por autopolinización, y en menor proporción por polinización cruzada (Luteyn 2002). Al no ser una planta domesticada y sujeta a la selección artificial, los frutos presentan características organolépticas variadas, desde dulces y jugosas hasta altamente astringentes y poco comestibles (National Research Council, 1989).

Cada fruto contiene numerosas semillas pequeñas (National Research Council, 1989). Se estima que en número oscilan entre 45 y 60, y presentan altas tasas de formación de semillas no maduras (Chaparro & Becerra, 1999). Esta especie presenta una morfología de polen característica de la ericáceas y con posible relevancia taxonómica, dada la gran diversidad morfológica que se encuentra en estudios de palinología de granos de polen en la familia Ericaceae y el género *Vaccinium* específicamente (Sarwar *et al.*, 2006). La anatomía de estos frutos los establece como drupas de estructura simple, en donde el endocarpo se constituye por una sola capa de esclereidas fácilmente separables en estado maduro. Como especie, *V. floribundum* presenta altas tasas de floración y la orientación unidireccional de sus flores facilita el trabajo de polinizadores, entre los cuales predominan las abejas y colibríes (Chaparro & Becerra, 1999).

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) está distribuido en las regiones andinas, en alturas entre 2800 y 4000msnm. Esta especie es particularmente abundante en la zona norte de la región andina, en países como Colombia, Perú y Venezuela. En esta zona, se lo encuentra entre los 1800 y los 3800msnm, y es recolectado de arbustos silvestres con fines comerciales, para su venta a nivel de mercados. En el Ecuador se han identificado tres especies de mortiño, la especie más abundante es *Vaccinium floribundum* Kunt; la cual se encuentra distribuida a lo largo de toda la Sierra, mientras

que *Vaccinium distichum* y *Vaccinium crenatum* se encuentran en la Sierra Sur, principalmente en las provincias del Azuay y Loja (Facultad de Ciencias Biológicas PUCE, 2008).

En Ecuador se consume el mortiño en varias formas: como fruta directamente, en forma de conservas, y como ingrediente de la colada morada (esta se prepara con ocasión del Día de los Difuntos el 2 de noviembre). En algunas zonas, las temporadas de maduración se vuelven ocasiones para días comunales en el campo, donde se lleva a cabo la recolección del fruto (National Research Council, 1989).

El mortiño ha sido establecido como un componente frecuente de los ecosistemas de páramos húmedos en varias regiones andinas, con estudios enfocados predominantemente en las cordillera orientales en Colombia y Ecuador (Spehn *et al.*, 2006; Moscol Olivera & Cleef, 2009). Esta especie muestra varias características destacables en su rol ecológico dentro de los páramos en donde se encuentra, como su elevada capacidad de regeneración a partir de la base de su raíz tras fenómenos destructivos como incendios (Ramsay & Oxley, 1996). También se han observado correlaciones positivas para la presencia de *V. floribundum* con otras especies, particularmente algunas briofitas comunes en las estructuras denominadas almohadillas (especies como *Sphagnum sparsum*) (Bosnian *et al.*, 2009). Es destacable la resistencia que presenta el mortiño a las heladas, razón por la cual se ha propuesto su potencial como fuente de genes de resistencia a climas fríos durante procesos de floración, una característica interesante para plantas ornamentales (Ballington *et al.*, 1993).

1.2.2 Propiedades fitoquímicas

Los frutos de mortiño, al igual que las bayas de otras especies del género *Vaccinium* tienen un potencial medicinal y nutricional debido a su alto contenido de

compuestos fenólicos antioxidantes y componentes como la vitamina C (Debnath, 2006; Vasco, 2009). Los frutos de *V. floribundum* Kunth además poseen otros compuestos como la cianidina, con posible actividad terapéutica contra desórdenes como diabetes, obesidad y cáncer. Se ha demostrado que las antocianinas reducen los niveles de mediadores de inflamación in vitro e in vivo. Las proantocianinas por su parte disminuyen la inflamación al regular la expresión de citoquinas y enzimas proinflamatorias. Varios extractos fenólicos de las bayas de *V. floribundum* se han probado in vitro y han dado como resultado la inhibición de la acumulación de lípidos, la prevención de la adipogénesis y la mediación de la respuesta inflamatoria al inhibir la expresión de especies reactivas de oxígeno por ejemplo, en macrófagos (Schreckinger *et al.*, 2010).

1.3 Diversidad genética

La diversidad genética es el nivel de la biodiversidad que se refiere a la variedad de alelos y genotipos presentes en un grupo en estudio. Incluye componentes del código genético de cada organismo y la variedad de éstos entre individuos dentro de una población y entre poblaciones de una misma especie. La diversidad genética es la base de la evolución ya que da a una especie la capacidad de adaptarse a las cambiantes condiciones ambientales a través del tiempo (Primack, 2006). Es importante también ya que a mayor diversidad genética una especie tiene mayor capacidad de colonizar nuevas áreas y ocupar nuevos nichos ecológicos. Por el contrario, una disminución en la diversidad genética hace que disminuya la posibilidad de persistencia de una especie en el ambiente, en el largo plazo. Del mismo es modo, la diversidad genética es importante para estudios de selección asistida al estudiar especies de interés económico (por sus características fitoquímicas o por su uso alimenticio u ornamental). Estas características

de interés tienen una base genética y se expresan de forma variable dentro de la especie (Rogers y Montalvo, 2004).

1.4 Marcadores Moleculares

Un marcador molecular es cualquier fragmento de ADN que indica una localización determinada en un genoma, y tiene una expresión identificable. Un marcador genético para ser útil debe ser de fácil detección, ser codominante, tener una expresión temprana en el desarrollo de un individuo, no interactuar con otros marcadores, requerir cantidades mínimas de material para ser identificado, tener una distribución homogénea en el genoma y presentar un alto nivel de polimorfismo o un gran número de variantes (Cubero, 2002).

Los marcadores moleculares pueden ser basados en hibridación de ADN o en PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Dentro de los marcadores por hibridación de ADN se agrupan las técnicas que emplean sondas para la detección de los marcadores. Las sondas son fragmentos de ADN o ARN que contienen el código complementario para una secuencia específica del genoma. Las técnicas más usuales son: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) y VNTR (*Variable Number Tandem Repeat*) (Cornide, 2000).

Los métodos de análisis basados en PCR remplazaron a los anteriores por su alta sensibilidad, su alto poder de discriminación y su facilidad de automatización. La poca información que se tenía de las secuencias en un inicio limitaba la aplicación de la PCR por lo que comenzaron a nacer técnicas basadas en amplificación arbitraria para generar marcadores como los RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y los AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). Mientras la cantidad de secuencias con las que se contaba aumentó, las técnicas que usaban PCR se dedicaron a amplificar

secuencias polimórficas conocidas. Así, se detectó diferencias en el tamaño del fragmento o diferencias en la secuencia del fragmento con primers diseñados para regiones de secuencia conocida. Dentro de los marcadores moleculares que utilizan PCR para amplificar secuencias polimórficas conocidas se incluye a los SSR (Simple Sequence Repeat), ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat), SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism), entre otros (Henry, 2013).

1.4.1 Microsatélites

Los marcadores microsatélites son secuencias de ADN cortas (1-6 bp) repetidas en tándem y flanqueadas por secuencias conservadas únicas de ADN que se pueden detectar mediante PCR (Miesfield *et al.*, 1981; Hamada y Kakanuga 1982). Los microsatélites fueron descubiertos por primera vez en seres humanos, pero se han encontrado en los genomas de la mayoría de los organismos. Los microsatélites se encuentran distribuidos en todo el genoma y presentan un gran número de alelos en cada locus, como consecuencia de altas tasas de mutación: 10^{-2} a 10^{-6} eventos por locus, por generación. El mecanismo que explica mejor su alto grado de polimorfismo de tamaño es la acumulación de errores producidos por el deslizamiento de la polimerasa durante la replicación del ADN (Li *et al.*, 2002).

Los microsatélites son marcadores codominantes (donde es posible detectar heterocigotos) y relativamente fáciles de identificar mediante PCR y técnicas de visualización mediante electroforesis o con primers marcados con fluorescencia y un equipo de detección de los fragmentos amplificados. Son marcadores altamente reproducibles cuando son diseñados y probados correctamente (Boches *et al.*, 2005).

1.4.2 Aplicaciones de los microsatélites

Los microsatélites son marcadores útiles en un amplio rango de análisis. Son una importante herramienta en el mapeo de genomas, como es el caso del genoma humano. Tienen aplicación en el diagnóstico biomédico como marcadores para ciertas condiciones de una enfermedad. Es decir, ciertos alelos están asociados con ciertas mutaciones en regiones del ADN que pueden causar una variedad de trastornos médicos de importancia. En el campo de la medicina forense se han convertido en el principal marcador para la identificación de evidencia basada en el ADN (McDonald y Potts, 1997).

En un contexto biológico/evolutivo son marcadores útiles para el análisis de diversidad genética y relaciones filogenéticas. Es posible a partir de aquí estimar la estructura genética de las poblaciones y subpoblaciones utilizando herramientas como estadísticas F y distancias genéticas (Parker *et al.*, 1998). Los microsatélites pueden ser utilizados para evaluar la historia demográfica (por ejemplo, para buscar evidencia de los cuellos de botella de poblaciones), para evaluar el tamaño efectivo de una población y para evaluar patrones de flujo genético entre poblaciones (Michalakis y Excoffier, 1996). Además, proporcionan datos adecuados para estudios filogeográficos que tratan de explicar la biogeografía y la historia genética de la flora y fauna de regiones determinadas. Este tipo de análisis son ampliamente utilizados al trabajar con poblaciones de varias especies o con poblaciones dentro de una misma especie (Parker *et al.*, 1998).

1.4.3 Estudios genéticos en el género *Vaccinium* con el uso de marcadores moleculares

Actualmente, los cultivares de *Vaccinium* se manejan exclusivamente con métodos tradicionales de reproducción. Su cultivo ha evolucionado desde la selección de clones silvestres de élite para el uso en cruces controlados y una selección rigurosa en el campo. Varias técnicas para la selección asistida por marcadores moleculares están emergiendo con el objetivo de maximizar la eficiencia del fitomejoramiento en este género. Estos marcadores también han sido una herramienta útil para estudios de identificación de especies y de diversidad genética tanto en especies cultivadas como en silvestres del género *Vaccinium* (Kole, 2011).

En blueberry, se ha utilizado una amplia variedad de marcadores como isoenzimas, RFLP, RAPD y SSR (Rowland *et al.*, 2003; Boches *et al.*, 2005, 2006) para obtener mapas de ligamiento y en estudios de huella genética. Para cranberry, (*V. macrocarpon*) se han llevado a cabo estudios con isoenzimas para medir los patrones de diversidad (Bruederle *et al.*, 1996). Además se ha utilizado marcadores RAPDs, SCARs (Sequence-characterized amplified región) y recientemente EST-SSR (Expressed Sequence Tag-Simple Sequence Repeat) heterólogos diseñados para blueberry para identificar cultivares de importancia comercial (Bassil *et al.*, 2009).

De los marcadores moleculares mencionados anteriormente, los marcadores SSR (microsatélites) son las herramientas más eficaces para la identificación de genotipos en individuos de varias especies del género *Vaccinium*. Boches *et al.*, (2005), desarrolló 30 pares de primers SSR derivados de bibliotecas EST y de bibliotecas de ADN genómico de cultivares de highbush blueberry. Estos marcadores SSR han sido utilizados en la identificación de cultivares de especies relacionadas como cranberry,

además fueron también muy eficaces en la estimación de relaciones genéticas entre cultivares de lowbush blueberry (Bell *et al.*, 2008).

A pesar de que el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites ha sido de gran ayuda en estudios de diversidad genética de especies vegetales y particularmente en estudios de identificación de especies del género *Vaccinium*; en Ecuador solo existe un estudio de caracterización molecular de mortiño de la comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la Provincia de Cotopaxi. En dicha investigación se utilizó un número bajo de muestras de mortiño (17) y se analizó los datos provenientes de 3 loci microsatélites, obteniendo resultados inconsistentes en cuanto a las agrupaciones y poco robustos estadísticamente (Roldán, 2012). Por esta razón, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar de la diversidad genética de mortiño en las provincias de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi con el uso de 12 primers heterólogos para la amplificación de regiones microsatélites del genoma del mortiño.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

- Caracterizar la diversidad genética de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) proveniente de 9 localidades de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi, mediante el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites.

2.2 Objetivos Específicos

- Establecer el porcentaje de transferibilidad de 12 primers heterólogos en mortiño.

- Determinar la diversidad genética y el polimorfismo alélico presentes en mortiño procedente de 3 provincias del Ecuador (Imbabura, Pichincha y Cotopaxi), usando marcadores microsátélites.
- Establecer los diferentes agrupamientos y patrones de distribución del mortiño, en base a su similitud evaluada con métodos estadísticos y bajo criterios de diversidad genética.
- Analizar la estructura poblacional del mortiño en Imbabura, Pichincha y Cotopaxi, en base a métodos bayesianos.

3. Área de Estudio

El material vegetal (hojas de mortiño) utilizado en el presente estudio, fue colectado en 9 localidades (San Pablo, Cotacachi-Cayapas, Cashaloma, Mojanda, Parque Nacional Cotopaxi Norte, Parque Nacional Cotopaxi sur, Ilinizas, Sigchos y Quilotoa) de tres provincias de la sierra ecuatoriana: Imbabura, Pichincha y Cotopaxi (Figura 1, Anexo 1). Los sitios de colección, en su mayoría, se encontraron dentro de parques nacionales y áreas protegidas; por lo que se obtuvieron los permisos de colección respectivos, otorgados por el Ministerio del Ambiente (No. 04 2012-IC-FAU-FLO-DPA/MA, No. 07-2012-IC-FLO-DPAP-MA y No. 06 12-IC-FAU-FLO.DPAC/MA), previo a la colección. El procesamiento de las muestras, los análisis moleculares y estadísticos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Quito- Ecuador.

4. Justificación

El mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) es una especie leñosa que crece en la región andina, en alturas entre 1800 y 3800 msnm; su fruto es una baya de coloración azul oscura y de sabor astringente. Este arbusto puede llegar a medir 3,5 metros (Luteyn, 2002). En países de Europa y Norteamérica se cultivan y comercializan diferentes especies pertenecientes al género *Vaccinium*, como el lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea*) y el blueberry (*Vaccinium corymbosum* y *Vaccinium angustifolium*), especies domesticadas en el siglo XX (Debnath, 2006). El consumo de frutos del género *Vaccinium*, ricos en antocianinas y proantocianidinas, induce efectos positivos sobre la salud humana, en condiciones que incluyen desórdenes biliares, escorbuto, desórdenes cardiovasculares, estrés oxidativo relacionado con la edad y respuestas inflamatorias (Garzón *et al.*, 2010), e incluso algunas especies muestran inhibición de crecimiento de células cancerígenas (Zhao *et al.*, 2004). Los frutos de *V. floribundum* Kunth además poseen otros compuestos como la cianidina, con posible actividad terapéutica contra desórdenes como diabetes, obesidad y cáncer (Schreckinger *et al.*, 2010).

En el país, el mortiño crece de forma silvestre y sus frutos son colectados de forma estacional en el mes de noviembre para la elaboración de la tradicional Colada Morada, con motivo del Día de los Difuntos. La fruta es también utilizada en la preparación de mermeladas y repostería. En el mercado internacional, el mortiño es conocido como “Andean Blueberry” y apreciado por sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitumorales (Luteyn, 2002). A pesar de que esta baya es altamente cotizada dentro y fuera del país por su importancia cultural, gastronómica y potenciales usos por su valor

nutricional y/o medicinal, existe muy poca información acerca de la biología básica y de la caracterización genética de este recurso biológico.

Conocer la variabilidad genética es esencial para poder determinar la distribución, estructura y estado actual de la población de mortiño en el Ecuador, así como su historia evolutiva y relaciones filogenéticas con especies emparentadas. Los resultados de esta investigación servirán para conocer la estructura poblacional y composición genética de esta especie así como también ofrecerán una base para la conservación de la diversidad de este importante recurso biológico.

5. Materiales

5.1 Colección de muestras de mortiño

- Tijeras
- Fundas ziploc pequeñas
- GPS (Garmin)
- Cooler portátil con geles de hielo.
- Marcador permanente

5.2 Extracción de ADN a partir de hojas de mortiño

- Morteros y pistilos
- Nitrógeno líquido (N₂)
- Buffer de extracción CTAB 2X
- 2, β-mercaptoetanol (SIGMA-ALDRICH)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Isopropanol

- Etanol 70%
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0).
- Cama de arena Multi-Blok Heater (ThermoScientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Tubos Eppendorf 1.5mL

5.3 Cuantificación de ADN de mortño

- NANODROP 1000 (ThermoScientific)
- Buffer TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Ultra-Pure Distilled Water (GIBCO)

5.4 Electroforesis en geles de agarosa

- SeaKem LE Agarose
- TBE 1X (Tris base -Acido Borico- EDTA)
- SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder DNA 100 bp (Invitrogen)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- Fuente de Poder EPS -300 II (C.B.S Scientific)
- Fotodocumentador Gel Doc XR (BIORAD)

5.5 Amplificación de regiones microsatélite SSR mediante PCR

- 11 pares de primers SSR (Tabla 1)
- Taq DNA polimerasa 5U/μL (Invitrogen)

- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- dNTP's 10 mM (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T Personal Thermocycler (Biometra)

5.6 Electroforesis en geles de acrilamida

- UltraPure™ Acrylamide (Invitrogen)
- UltraPure™ N,N'-Methylenebisacrylamide (Invitrogen)
- TBE 10X (Tris – Ácido Bórico – EDTA)
- UltraPure™ UREA (Invitrogen)
- Detergente Alconox
- Cleaning sheets-Kimwipes (Kimberly-Clark)
- Etanol 70%
- Rain.X™
- Sigmacote® (SIGMA)
- Solución para tratamiento de vidrios: etanol 96% y ácido acético glacial 0.5%.
- Bind-Silane (3-Trimethoxysily-propyl-methacrylate 98%) (SIGMA-ALDRICH).
- Persulfato de amonio (J.T. Baker)
- UltraPure™ TEMED (N-tetramethylethilenediamine) (Invitrogen)
- TBE 1X (Tris base -Ácido Bórico- EDTA)

- Buffer de carga para pre-corrida (Glicerol + Azul de Bromofenol)
- Blue Juice 10X (Invitrogen)
- Ladder 10bp (Invitrogen)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- T100 Thermal Cycler (BIORAD)
- Sequi-Gen Cell GT System (BIORAD)
- Fuente de poder PowerPac HV (BIORAD)

5.7 Tinción de Plata

- Solución fijadora y de parada (200ml de alcohol absoluto (J.T. Baker), 10ml de ácido acético glacial (MERCK) y 1790ml de agua destilada).
- Solución de tinción (4g de nitrato de plata (FISHER), 3ml de formaldehído 37% (MERCK) y 2000ml de agua destilada).
- Solución reveladora (30g de hidróxido de sodio (MERCK), 4 ml de formaldehído 37% (MERCK) y 2000ml de agua destilada).

5.8 Fotografía de geles

- Cámara fotográfica (Canon XPOSZ)

6. Métodos

6.1 Obtención del material vegetal

Las localidades seleccionadas para el muestreo de hojas de mortiño se encontraron en su mayoría dentro de áreas protegidas, por lo que previo la colección del material vegetal se obtuvo los permisos de investigación No. 04 2012–IC-FAU-FLO-DPA/MA, No. 07-2012-IC-FLO-DPAP-MA y No. 06 12-IC-FAU-FLO.DPAC/MA,

otorgados por los Ministerios del Ambiente de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi respectivamente.

Se colectó hojas de mortiño en las zonas montañosas de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi en 4 salidas de campo. En cada provincia se determinó 3 sitios de colección: en la provincia de Imbabura estos fueron: San Pablo, reserva Cotacachi-Cayapas y Cashaloma; en Pichincha se colectó en el Parque Nacional Cotopaxi (entrada norte), reserva ecológica “Los Ilinizas” y en Mojanda; y en Cotopaxi se muestreó en el Parque Nacional Cotopaxi (entrada sur), en Sigchos y en Quilotoa (vía a la Maná). En cada sitio se colectó hojas de 12 a 15 individuos, para un total de 129 muestras distribuidas en las 9 localidades (Figura 1 y Anexo I). La colección comprendió las fases de identificación de la especie, corte de 6-8 hojas de cada individuo, toma de coordenadas satelitales con GPS del sitio de cada colecta, etiquetado y almacenamiento de cada muestra en fundas plásticas selladas Ziploc®. Posteriormente las muestras se transportaron dentro de hieleras a 4°C, para mantener la cadena de frío hasta el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito donde se colocaron en un congelador a -20°C, hasta su posterior uso.

6.2 Extracción y cuantificación de ADN de mortiño

Se realizó la extracción de ADN a partir de hojas de mortiño mediante el protocolo de Saghai-Marroof, *et al.*, (1984) pre estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. Se colocó aproximadamente 80 mg de tejido foliar en un mortero, se trituró con nitrógeno líquido y se agregó 800 µl de buffer CTAB 2X. Se transfirió a un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml y se añadió 8 µl de 2, β-mercaptoetanol. Se homogeneizó e incubó las muestras a 62°C en una cama de arena, durante una hora, con agitación por inversión de los tubos

cada 15 minutos. Se agregó 500 µl de una solución de cloroformo – alcohol isoamílico 24:1, se dejó en reposo por 20 minutos y se centrifugó por 20 minutos a 13200 rpm. Se recuperó 500 µl del sobrenadante y se agregó un volumen equivalente de isopropanol frío, se mezcló por inversión para precipitar el ADN. Se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos, se observó el pellet y se descartó el sobrenadante. A continuación se lavó el pellet con 800 µl de etanol al 75%. Se agitó el tubo para que se despegue el pellet y se removió el etanol con una micropipeta. Finalmente se dejó secar el pellet dentro de una cámara de flujo y se resuspendió en 50µL de TE 1X (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0). Las muestras de ADN fueron conservadas a -20°C en una congeladora.

La calidad de ADN de cada muestra fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5%, con el uso de SYBR® Safe DNA gel stain (Invitrogen) y de un fotodocumentador Biorad Gel Doc XR (BIORAD) (Figura 2). La concentración de ADN se determinó con el uso de un espectrofotómetro Nanodrop 2000™ (Thermo Scientific) (Tabla 2).

Todas las muestras de ADN fueron diluidas a una concentración final de 10 ng/µL para su posterior uso en las reacciones de PCR y se almacenaron junto con los Stocks (concentración original) a -20°C.

6.3 Selección de primers y amplificación de regiones microsatélites

Después de realizar una revisión bibliográfica de estudios que utilizan marcadores moleculares en especies del género *Vaccinium*, (Bassil *et al.*, 2009, Hinrichsen, *et al.*, 2009, Boches *et al.*, 2005, Boches *et al.*, 2006); se seleccionaron 12 pares de primers heterólogos diseñados por Boches *et al.*, en 2005 para regiones microsatélites de *Vaccinium corymbosum* L (highbush blueberry) (Tabla 1). De éstos, 10 provienen de librerías EST (prefijos NA y CA) y 2 de librerías genómicas (prefijo

VCC). Para la selección de los primers se consideró criterios de transferibilidad a otras especies del género *Vaccinium* y presencia de elevado número de alelos.

Al ser primers heterólogos que no se han probado antes en mortiño, se realizó PCR de gradiente con muestras de ADN de mortiño escogidas al azar para determinar la temperatura óptima de annealing de cada par de primer (Tabla 1). A continuación se realizó reacciones de PCR con la temperatura de annealing establecida para todas las muestras de ADN.

Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 10 µl, compuestos por Buffer de PCR (1X) (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 0.2 mM de dNTPs (Invitrogen), 0.2 mM de cada primer, 0.375 unidades de Taq polimerasa (Invitrogen), y 10 ng de ADN genómico (Boches *et al.*, 2005). Se amplificó el ADN en 35 ciclos en un termociclador T Personal Thermocycler (Biometra) programado para 40 segundos de desnaturalización a 94°C, 40 segundos de annealing a la temperatura óptima de cada par de primers (Tabla 1) y 40 segundos de extensión a 72°C (Boches *et al.*, 2005).

6.4 Electroforesis en geles de poliacrilamida y tinción con nitrato de plata.

Los productos de la amplificación de las regiones microsátélites se visualizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% o al 4% con el uso del sistema Sequi-Gen™ (Biorad) y un protocolo ya estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito. El revelado se realizó con nitrato de plata en base al protocolo de Benbouza (2006).

Para este procedimiento, se lavó el vidrio 4 veces con el detergente Alconox, se limpió con etanol al 70% y se trató de forma homogénea con 2 ml de una solución bind silane, La cámara se limpió con etanol al 70% y fue tratada de forma homogénea con 3 ml de Rain.X™ y 800 µl de Sigmacote® (SIGMA). Posteriormente se limpió los

separadores, la base de polimerización, los brazos de la cámara y el peine con etanol al 70%. Se ensambló la cámara de electroforesis de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se inyectó 100 ml de acrilamida al 6% (5M Urea y acrilamida/bisacrilamida 19:1) mezclada previamente en un vaso de precipitación con 545 μ l de persulfato de amonio 10% y 109 μ l de TEMED. Se introdujo el peine con las puntas hacia afuera para formar el frente de corrida y se dejó polimerizar el gel durante una hora. Una vez polimerizado, se pasó el gel a la base de corrida, se retiró el peine, se limpió el frente de corrida y se formó los pocillos introduciendo el peine con las puntas hacia abajo. Posteriormente, se realizó la precorrida durante 30 min a 80 Watts, para lo que se colocó en la base y en la cámara de electroforesis 1.5 L de TBE 1X, y en los pocillos se colocó buffer de carga a fin de verificar la calidad de éstos y del gel. Para la preparación de las muestras, para la corrida, se añadió 1 μ l de Blue Juice 10X (Invitrogen) a cada uno de los productos de PCR para una concentración final de 1X. Se preparó también ladder con 27.5 μ l de agua de PCR, 2.5 μ l de Blue Juice 10X y 5 μ l de ladder 10 bp (Invitrogen). El ladder 10bp y las muestras preparadas se desnaturalizaron a 95°C durante 5 minutos. Una vez finalizada la pre-corrida se cargó 5 μ l de las muestras denaturadas en los pocillos y 3 μ l del ladder 10bp (Invitrogen). Se corrió la electroforesis a 80 Watts y 48°C durante dos horas y media.

Después de finalizada la corrida, se realizó la tinción y revelación del gel siguiendo el procedimiento que se detalla a continuación. Se separó el vidrio (con el gel adherido en su superficie) de la cámara y se dejó en reposo durante 5 minutos en una bandeja con una solución fijadora fría (10 ml de ácido acético glacial, 200 ml de alcohol absoluto y 1790 ml de agua destilada), luego se agitó levemente durante 7 minutos en oscuridad en una bandeja con una solución de tinción (4 gramos de nitrato de plata, 3

ml de formaldehído al 37% y 2 litros de agua destilada), se lavó durante 10 segundos con 2 litros de agua destilada en oscuridad, después se reveló con movimientos leves durante 7 minutos en oscuridad en una bandeja con una solución de revelado (30 gramos de hidróxido de sodio, 4 ml de formaldehído al 37% y 2 litros de agua destilada), inmediatamente se pasó a la solución fijadora por 3 minutos, se realizó un segundo lavado con 2 litros de agua destilada y se dejó secar el gel a temperatura ambiente para su posterior análisis.

6.5 Toma de datos y elaboración de matrices alélicas

A partir de los geles de poliacrilamida se identificó los alelos presentes en cada individuo de mortiño para los 11 loci analizados (se probó 12 pares de primers pero uno no amplificó). Se tomó en cuenta los alelos visibles en el rango de tamaño reportado por la bibliografía o en tamaños cercanos (Boches *et al.*, 2005). Además, se midió la distancia en centímetros de las bandas del ladder 10bp (de tamaño conocido en pares de bases) y de cada alelo, respecto al frente de corrida, para estimar por interpolación lineal el tamaño en pares de bases de los alelos encontrados (Tabla 1).

Se asignó a cada alelo un número entero y se codificó en una matriz de Excel con el nombre de los loci en columnas y el de los individuos en filas. Esta matriz alélica fue la base para el análisis estadístico y para la estimación de la estructura poblacional.

6.6 Análisis de diversidad genética de mortiño

Se utilizó el complemento para Excel GenAlEx 6.501 (Peakall, 2012) con el que se obtuvo valores de diversidad genética como: frecuencia alélica, número de alelos promedio (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigocidad esperada (H_e), heterocigocidad observada (H_o), índice de Shannon (I), índice de fijación (F), distancias de Nei y estadísticos F (F_{st}) de Wright, para cada una de las 9 localidades. Estos

mismos índices se calcularon para cada provincia y para todo el set de datos (Tablas 3 y 4). Se realizó también un análisis de varianza molecular (AMOVA) a fin de determinar la variación intrapoblacional (dentro de cada localidad), interpoblacional (entre localidades) y entre provincias para la muestra en estudio y una prueba de Mantel con GenAlEx 6.501 para establecer si existe o no una correlación entre la distancia geográfica de los individuos de mortiño de las distintas localidades y la distancia genética estimada a partir de la matriz alélica.

Con el programa DARwin 5.0.158 (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006) se construyó una matriz de distancia, un dendrograma con el método Neighbor Joining para evidenciar los agrupamientos de los individuos de mortiño y un PCoA para la visualización de la dispersión de los individuos de mortiño en base a distancias Euclidianas.

6.7 Estimación de la estructura poblacional de mortiño

inferencia bayesiana con el uso del programa Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000); a fin de estimar el número de subpoblaciones existentes dentro de la población original. Se realizó cuatro análisis diferentes, en el primero se probaron valores de $K=1$ a $K=10$ (K = número supuesto de poblaciones) con 15 repeticiones independientes para cada uno, con un modelo con *admixture*, con 100000 pasos de *burn-in* y 100000 pasos de corrida de cálculos de Markov Chain y Montecarlo, sin información previa referente al sitio de colección. En un segundo análisis, como información previa se incluyó la localidad de donde provienen las muestras (Cotacachi-Cayapas, San Pablo, Cashaloma, Parque Nacional Cotopaxi norte, Ilinizas, Mojanda, Parque Nacional Cotopaxi sur, Sigchos y Quilotoa), en el tercer análisis la localidad y la provincia de origen (Imbabura, Pichincha y Cotopaxi); y en el cuarto análisis la localidad y una nueva

categoría definida como región geográfica. Se establecieron tres regiones geográficas (grupos de acuerdo a ubicación geográfica de los sitios de muestreo): la primera incluye a las localidades San Pablo, Cotacachi-Cayapas, Cashaloma y Mojanda, la segunda se conforma por las localidades Parque Nacional Cotopaxi Norte, Parque Nacional Cotopaxi sur e Ilinizas y la tercera incluye las localidades de Sigchos y Quilotoa. Para estimar el número de subpoblaciones (K óptimo), se utilizó el doble logaritmo natural de la probabilidad de cada K (delta K) (Evanno *et al.*, 2005). Esto se realizó en la versión online de *Structure harvester* ([http://tayloro.biologyucla.edu/ Struct_harvest](http://tayloro.biologyucla.edu/Struct_harvest)). Los resultados de las 15 corridas independientes para el K óptimo establecido, se integraron en el software CLUMPP utilizando un algoritmo *greedy* (Jakobsson and Rosenberg, 2007) para obtener una matriz consenso. A partir de estos resultados se visualizó los gráficos de la estructura final con el uso del software Distruct 1.1 (Rosenberg, 2002) y Adobe Illustrator.

7. Resultados

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

Se muestreó hojas de 43 individuos de mortiño en Imbabura, de 43 individuos de mortiño en Pichincha y de 43 individuos de mortiño en Cotopaxi; en total 129 muestras en las tres provincias en estudio (Anexo 1). Se realizó la extracción de ADN de las 129 muestras de mortiño colectadas, de las cuales 126 fueron exitosas con concentraciones de ADN de hasta 753 ng/ μ L (Tabla 2). El ADN extraído resultó ser de buena calidad, dado su alto peso molecular, como se observa en la Figura 2.

7.2 Amplificación de regiones microsatélites con primers heterólogos

Se probó 12 pares de primers diseñados para blueberry (Boches *et al.*, 2005) con 11 de éstos se obtuvo productos de la amplificación, y de estos, 10 mostraron productos polimórficos (Figuras 3 y 4). El porcentaje de transferibilidad fue del 91,67% para el set de primers probados. Los datos obtenidos con el primer 6 (CA787F) que fue monomórfico (Tabla 1) también se incluyó en los análisis de diversidad genética y de estimación de la estructura poblacional.

7.3 Diversidad alélica de mortiño

El número total de alelos fue 63 para las 126 muestras en los 11 loci estudiados. El promedio general fue de 4.46 alelos por locus (Tabla 4). Un solo locus (CA787F) fue monomórfico, y en los 10 loci polimórficos el rango del número de alelos identificados varió entre 2-14, donde los loci NA1040 y CA794F0 fueron los más informativos con 11 y 14 alelos respectivamente (Tabla 1). De los 46 alelos observados en Imbabura, 3 fueron exclusivos, en Pichincha se identificó 53 alelos de los cuales 5 fueron exclusivos para esta provincia y en Cotopaxi, de los 48 alelos encontrados, 4 fueron exclusivos para esta provincia (Tabla 2). El número de alelos efectivos por provincia varió entre 2.07 y 2.56, con una media global de 2.41 alelos efectivos por locus (Tabla 4).

7.4 Diversidad genética de mortiño

El análisis de varianza molecular (AMOVA) muestra que el 85% de la diversidad genética corresponde a la variabilidad intrapoblacional, el 14% corresponde a la variabilidad interpoblacional y el 1% a la variación entre regiones o provincias (Figura 5). A continuación se detalla los resultados de cada categoría.

7.4.1 Diversidad genética intrapoblacional

Los resultados de las diferentes medidas de diversidad genética intrapoblacional usadas (Tablas 3 y 4) son compatibles entre sí y muestran un rango intermedio de heterocigocidad esperada o diversidad genética, con un promedio general de 0.42. En las tres provincias la heterocigocidad esperada es ligeramente mayor que la observada. El índice de Shannon indica una alta variabilidad entre los individuos de mortiño en todas las localidades de todas las provincias, con valores en un rango entre 0.77 y 0.94 (con excepción de los individuos de mortiño de Quilotoa $I=0.24$); y una media general de 0.85 (Tabla 4). El índice de fijación promedio (coeficiente de inbreeding) fue de 0.14 (Tabla 4), con dos localidades (Parque Nacional Cotopaxi Norte y Sigchos) que muestran valores negativos (Tabla 3), lo que indica una mayor frecuencia de heterocigocis observada que esperada en estas áreas.

7.4.2 Diversidad genética interpoblacional

A partir de la matriz alélica se generaron matrices de distancia genética de Nei y de distancia genética de Wright (F_{st}) (Tablas 5 y 6), donde se comparan las distancias genéticas de las localidades en pares. Entre las localidades de Cashaloma y San Pablo y entre las localidades del Parque Nacional Cotopaxi Norte y Parque Nacional Cotopaxi Sur se observan las menores diferencias genéticas. El resto de localidades muestran también una alta similitud genética entre ellas, con excepción de la localidad de Quilotoa. Los mayores valores de distancia genética encontrados se observan entre la localidad de Quilotoa y las 8 localidades restantes, con un rango de 0.226-0.403 (Distancias genéticas de Nei) y 0.198-0.282 (distancias genéticas de Wright (F_{st})).

El análisis mediante el método de Neighbor Joining con el que se obtuvo el dendrograma (Figura 6) revela una escasa estructura poblacional, donde la mayoría de

agrupamientos genéticos son mezclados y contienen individuos de mortiño de las tres provincias. Existe un agrupamiento solo con individuos de mortiño de la provincia de Imbabura (muestras en color verde de código “CL”, “CC” y “SP” seguido de un número de dos dígitos) y otro agrupamiento sólo con individuos de mortiño de Cotopaxi específicamente de la localidad de Quilotoa (muestras en color naranja de código “QU” seguido de un número de dos dígitos).

Estos resultados son consistentes con el gráfico de PCoA (Figura 7) donde a excepción de la localidad de Quilotoa (marcadores naranjas agrupados en el cuadrante superior izquierdo) todos los individuos de mortiño se encuentran distribuidos en el plano sin agrupaciones evidentes. Las muestras de los individuos de mortiño provenientes de la provincia de Cotopaxi (color naranja) tienen una amplia distribución, la mayoría se localizan en los cuadrantes superior e inferior izquierdo, algunas en el centro del plano y unas pocas en el cuadrante superior derecho. Las muestras de los individuos de mortiño provenientes de Imbabura (color verde) se localizan predominantemente en los cuadrantes superior e inferior derechos (focalizados en el cuadrante superior derecho) y las muestras de los individuos de mortiño provenientes de Pichincha (color azul) se ubican en su mayoría en el centro del gráfico. Algunas muestras de individuos de mortiño en los cuadrantes superiores izquierdo y derecho y varias muestras de la localidad de Mojanda se observan en el cuadrante inferior derecho.

Al no existir evidencia de una agrupación de acuerdo a la localidad o provincia de origen de las muestras de mortiño, se realizó un test de Mantel, con el fin de saber si los individuos de mortiño, en el área analizada, siguen un modelo de aislamiento por distancia geográfica. La Figura 8 relaciona la distancia geográfica en el eje x versus la

distancia genética en el eje y. Se observa una correlación entre las dos variables, sustentada por el coeficiente de correlación $r_{xy} = 0.3$ y $P < 0.001$.

7.5 Estructura poblacional

En un primer análisis se probó valores de K del 1 al 10 y se descartó los valores de K mayores a 4 ya que el logaritmo de la probabilidad de que estos valores sean óptimos fue bajo. Con K del 1 al 4, los gráficos de asignación de ancestro no sugerían ninguna estructura consistente entre repeticiones, por lo que se incluyó para los siguientes análisis la información previa disponible como el sitio de colección (localidad y provincia de origen de los individuos de mortiño).

En un segundo análisis, al incluir como información previa la localidad de origen de los individuos de mortiño se encontró un valor óptimo de $K=2$. Sin embargo, el componente genético ancestral de la localidad de Mojanda no fue consistente entre repeticiones y los gráficos de asignación de ancestro fueron difíciles de interpretar (no se muestran estos resultados). Por esta razón, se realizó un tercer análisis incluyendo la localidad y la provincia de origen de las muestras de mortiño. Con esta información previa se encontró un valor óptimo de $K=2$ mediante la evaluación por el método de Evano *et al.* 2005 (Tabla 7). Como se muestra en la Figura 9a, existen dos líneas ancestrales bien marcadas (color azul y color fucsia) que separan a los individuos de mortiño en dos grupos genéticos: el primero incluye a todos los individuos de mortiño de las localidades de la provincia de Imbabura: Cotacachi Cayapas, San Pablo y Cashaloma, el segundo a los individuos de las localidades de Sigchos y Quiltoa de la provincia de Cotopaxi. Los individuos de las localidades restantes (Mojanda, Parque Nacional Cotopaxi norte, Parque Nacional Cotopaxi Sur e Ilinizas) presentan un patrón híbrido entre los dos grupos, con mayor carga ancestral del grupo de Imbabura.

El cuarto análisis se llevó a cabo incluyendo como información previa la localidad de origen de los individuos de mortiño y la región geográfica de estas localidades (Figura 10). Se tomó en cuenta la ubicación geográfica de los individuos de mortiño y no una división geopolítica de las provincias de donde provienen ya que estas divisiones no tienen significancia biológica. Como se presenta en la Figura 10, existe cercanía entre las localidades de Parque Nacional Cotopaxi Norte y Parque Nacional Cotopaxi Sur (coordenadas geográficas S0 33.825 W78 26.568 y S0 38.989 W78 30.600 respectivamente), que se encuentran ubicadas en el mismo complejo geográfico (además de ser parte del mismo Parque Nacional), a pesar de que el límite provincial cruce a este parque y lo divida en dos. Esta primera región geográfica se completa con la inclusión de la localidad de Ilinizas (coordenadas geográficas S0 36.295 W78 41.004), ubicada en una latitud casi equivalente a la del Parque Nacional Cotopaxi, pero hacia la cordillera occidental. La segunda región geográfica se compone de la localidad de Mojanda (coordenadas geográficas N0 05.447 W78 14.683) ubicada al norte de Pichincha, y de las 3 localidades de la provincia de Imbabura: Cotacachi-Cayapas, Cashaloma y San Pablo (coordenadas N0 18.585 W78 21.020, N0 15.554 W78 08.793 y N0 14.021 W78 10.620, respectivamente). La tercera región geográfica incluye a Sigchos y Quilotoa (coordenadas geográficas S0 47.429 W78 56.027 y C034 respectivamente), las dos en la zona sur de la región muestreada.

Este análisis dio como resultado un valor óptimo de $K=3$, mediante una comprobación con el método de Evanno *et al.* (2005) (Tabla 8), en donde los coeficientes de asignación de ancestro coinciden en su totalidad con la información previa. Es decir, una línea ancestral (color fucsia) incluye a todas las localidades de la primera región geográfica (Parque Nacional Cotopaxi norte, Parque Nacional Cotopaxi

sur e Ilinizas), otra línea ancestral (color azul) incluye a todas las localidades de la segunda región geográfica (Cotacachi-Cayapas, Cashaloma, San Pablo y Mojanda) y una tercera línea ancestral (color verde) coincide con la tercera región geográfica compuesta por las localidades de Sigchos y Quilotoa (Figura 9b, Figura 10).

8. Discusión

8.1 Colección de muestras de mortiño y extracción de ADN

El método empleado para el transporte de las muestras de mortiño desde el campo hasta el laboratorio resultó efectivo para la conservación del material vegetal en condiciones adecuadas para la posterior extracción de ADN. De igual manera, el protocolo de extracción de ADN de Saghai-Marooof, *et al.* (1984), estandarizado previamente en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal fue eficiente para la obtención de ADN de alta calidad y concentración a partir de hojas de mortiño. Este protocolo utiliza un detergente no iónico bromuro de cetiltrimetilamonio o CTAB. El CTAB es utilizado por su capacidad de liberar a los ácidos nucleicos celulares y además formar complejos con los mismos, con lo cual se facilita su separación de los demás componentes celulares (Ausubel *et al.*, 2003) y ha sido reportado ampliamente en la bibliografía para la extracción de ADN a partir de tejidos vegetales. Sólo 3 de las 129 muestras colectadas presentaron problemas en la extracción, posiblemente a causa de errores durante el proceso (lavado del pellet con etanol al ser el pellet muy pequeño) o por el tipo de material vegetal (hojas de mortiño viejas).

8.2 Amplificación de regiones microsátélites con primers heterólogos.

Para este estudio se probaron 12 pares de primers heterólogos (diseñados para blueberry), de los cuales un par no amplificó ninguna región del genoma de mortiño. Es

importante mencionar que de los 11 pares de primers que amplificaron loci polimórficos y altamente informativos en el presente estudio, 10 fueron diseñados a partir de librerías de EST-SSR y 1 de librerías genómicas. El porcentaje de transferibilidad de primers heterólogos en mortiño fue 91.67%, similar al reportado por otros estudios con especies del género *Vaccinium*. Por ejemplo, en un estudio que buscó probar la transferibilidad y polimorfismo de 39 EST-SSR y 10 SSR genómicos diseñados para blueberry (*V. corymbosum*) para analizar 14 representantes de cranberry (7 de *V. macrocarpon* y 7 de *V. oxycoccus*), se reporta 84.6% de transferibilidad para EST-SSR 60-70% de transferibilidad para SSR de librerías genómicas (Bassil *et al.*, 2009). Es esperado un alto porcentaje de transferibilidad de primers diseñados a partir de librerías de ESTs ya que provienen de cDNA, es decir, de secuencias expresadas en el genoma de una especie. Estas regiones expresadas son altamente conservadas entre especies de un mismo género e incluso en taxones más distantes. Hasta el momento, las aplicaciones más comunes de EST-SSRs incluyen estudios de mapeo genético, de selección asistida por marcadores y de diversidad en especies cultivadas. Sin embargo, los marcadores EST-SSR también tienen un claro potencial para ser usados en aplicaciones evolutivas básicas, tales como los análisis de genética de poblaciones de especies silvestres (como el mortiño), donde no existe información previa del genoma y que son de interés para la conservación. (Ellis & Burke, 2007).

8.3 Diversidad alélica de mortiño

El número promedio de alelos obtenidos en este estudio fue 4,46 por locus, comparable con estudios donde el número de alelos promedio es bajo en especies con autopolinización como el arroz (5.13 alelos por locus para SSR genómico, 2.78 alelos por locus para EST-SSR) (Cho *et al.*, 2000), en comparación con especies con

polinización cruzada como el girasol (12 alelos por locus), (Tang y Knapp 2003) o el blueberry (18.2 alelos por locus) (Boches *et al.*, 2005). Además del blueberry, otras especies del género *Vaccinium* con las que se ha hecho análisis con marcadores moleculares también presentan polinización cruzada y un elevado número de alelos promedio por loci, por lo que estos resultados no son comparables con los encontrados para mortiño que es una especie con principalmente autopolinización. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que pueden presentarse varios artefactos en la PCR utilizando marcadores SSR que pueden explicar el bajo número de alelos. Un ejemplo son los genotipos nulos, causados por mutaciones que resultan en la pérdida de un sitio de anclaje del primer y a su vez representa una pérdida de codominancia (Boches, 2005).

8.4 Diversidad genética de mortiño

Los resultados de la prueba de AMOVA indican un elevado porcentaje de variación genética intrapoblacional (85%) y un bajo porcentaje para la variación interpoblacional (14%). Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Albert *et al.* en el 2004, en un estudio de caracterización de la estructura genética en poblaciones de *Vaccinium myrtillus* con RAPDs donde la prueba de AMOVA mostró que 13,81% de la variabilidad genética existente corresponde a la variación entre las poblaciones y el 86,19% restante a la variación dentro de las poblaciones. Este y otros estudios con resultados similares sugieren una elevada dispersión de semillas en especies de vida larga del género *Vaccinium*, con sistemas de autopolinización y polinización cruzada. En el caso del mortiño, esta dispersión se da principalmente por colibríes y por insectos como abejas gracias a la disposición tubular de las flores de esta especie (Luteyn, 2002).

La heterocigocidad observada promedio fue 0.357, un resultado menor que el calculado en dos poblaciones de lingonberry (0,548 y 0,587), con un promedio de 0,568 con el uso de marcadores moleculares tipo RAPDs. En este estudio con lingonberry, se utilizó 43 loci, a diferencia de los 11 loci analizados en mortiño, además se identificó clones (individuos con el mismo patrón de bandas que provienen del mismo sitio de colección) que son muy comunes en especies con crecimiento clonal o vegetativo (Persson y Gustavsson, 2001). El mortiño es una especie esencialmente con autopolinización, por lo que se espera valores bajos de heterocigocidad con respecto a especies de polinización cruzada como el lingonberry. Además, el mortiño presenta propagación clonal y vegetativa, por lo que, al no haber identificado clones de individuos de mortiño provenientes de la misma localidad, puede haberse subestimado el valor de heterocigocidad.

La heterocigocidad esperada promedio fue 0.42, valor que representa una diversidad genética moderada, similar a la reportada para individuos de *Vaccinium parvifolium* ($He=0.445$) en un estudio con microsatélites donde se evalúa la estructura genética de poblaciones de esta especie en California del Norte (DeWoody *et al.*, 2012). Nuevamente, al transferir marcadores moleculares tipo microsatélites a diferentes especies, la mutación del sitio de adhesión del primer puede dar lugar a alelos nulos, que no producen productos de PCR visibles y que pueden incrementar medidas de endogamia como el índice de fijación, y reducir otras medidas como la heterocigocidad.

Al realizar el análisis de datos para estimar la diversidad interpoblacional de mortiño se utilizó distancias de Nei y de Wright (F_{st}) donde se compara todas las localidades entre sí. Como se observa en las Tablas 5 y 6, los valores encontrados son bajos, lo que indicaría que los individuos de mortiño de todas las localidades en estudio

son muy similares entre sí (valores entre 0.017-0.142), con excepción de los individuos de la localidad de Quilotoa en la provincia de Cotopaxi, que tienen una notoria diferenciación (valores entre 0.226 - 0.403) de los individuos de mortiño del resto de localidades. De igual manera, tanto en el dendrograma como en el PCoA, los individuos de mortiño de Quilotoa se agrupan de forma independiente del resto (Figuras 6 y 7). De acuerdo a los datos de la colección de muestras, los individuos de mortiño de Quilotoa se encontraron entre 4087 msnm y 4109 msnm, a diferencia de los individuos de las demás localidades que se encontraron hasta máximo 3700 msnm. Esto puede explicar la disimilitud genética hallada, así como las características fenotípicas observadas en el campo. Las plantas de mortiño de Quilotoa son pequeñas, crecen a ras de suelo y presentan muy pocas flores o frutos; mientras que las plantas de mortiño del resto de localidades crecen en forma de arbustos de hasta 1 metro, dispersados en un área mayor y con abundantes flores y en algunos casos frutos.

8.5 Estructura Poblacional

Los algoritmos diseñados para la agrupación de datos genéticos se han convertido en una herramienta importante en una serie de campos como la genética de poblaciones y la conservación (Hubisz *et al.*, 2009). Tales métodos se utilizan a menudo para comprender la estructura de las poblaciones, así como para identificar individuos migrantes o híbridos. El software Structure aplica un método bayesiano en base a algoritmos, que se utiliza ampliamente para la agrupación de datos genéticos (Pritchard *et al.*, 2000). Dado un número de clusters (K) y suponiendo equilibrio de Hardy-Weinberg y equilibrio de ligamiento dentro de los grupos, Structure calcula las frecuencias alélicas en cada grupo y la composición genética para cada individuo.

Para el resultado presentado con $K=2$ (Figura 9a), existen al menos dos mecanismos reportados que podrían dar como resultado este modelo de estructura poblacional: una clasificación incompleta de linajes o una hibridación (*admixture*) que ocurrió en la historia evolutiva de la especie (Comunicación personal Jaime Chaves, marzo 2014) (Morando *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2012; Blanco-Pastor *et al.*, 2012).

El análisis de la estructura poblacional de una especie se realiza desde un enfoque filogeográfico, donde se busca explicar la distribución geográfica actual de los individuos de una especie, en base al estudio de los procesos históricos responsables de la misma (Avice, 2000). Hasta el momento, no existen publicaciones acerca de la historia evolutiva del género *Vaccinium* ni del mortiño en la región andina, lo que si se conoce son las fluctuaciones en la diversificación de la flora y fauna ocurridas en diferentes regiones del planeta durante el período cuaternario (Qu *et al.*, 2012).

Las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno han tenido efectos profundos en la distribución geográfica y en la diversidad genética de las especies existentes (Hewitt 1996). Durante los períodos glaciales, la distribución de las poblaciones de las especies existentes se limitó a unos pocos refugios fragmentados. Este aislamiento en múltiples refugios glaciales originó la diferenciación genética entre poblaciones de la misma especie. Sin embargo, la divergencia inducida por los períodos glaciares pudo ser inhibida durante períodos interglaciares más cálidos, ya que las poblaciones aisladas previamente se expandieron, y entraron en contacto con las demás. Estas expansiones postglaciales proporcionaron múltiples oportunidades para el flujo génico entre las poblaciones anteriormente divergentes (Carstens y Knowles 2007). El flujo génico durante la mezcla o hibridación de los individuos en los períodos interglaciares (*secondary admixture*) puede ocultar la diferenciación genética que se formó durante

los períodos glaciales, lo que complica la interpretación de los patrones genéticos actuales. Esta situación es más compleja en linajes genéticos que divergieron recientemente (Li *et al.*, 2009; Qu *et al.*, 2011). Cuando las poblaciones de linajes que han evolucionado recientemente divergen, la transición a un grupo monofilético requiere de 8-12 generaciones de N_e (tamaño efectivo de la población) (Hoelzer, 1997). Por lo tanto, se espera que los linajes descendientes compartan alelos polimórficos con la población ancestral durante algún tiempo (esto es una clasificación incompleta de linajes). En contraste, los linajes que se separaron por completo también pueden compartir regiones polimórficas debido al *secondary admixture*. La clasificación incompleta de linajes y el *secondary admixture* dan lugar a patrones genéticos similares, por lo que el intercambio de alelos provenientes de dos linajes puede ser el resultado de cualquiera de los dos procesos o de ambos (Qu *et al.*, 2012).

De acuerdo a todo lo expuesto anteriormente, en el caso de la estructura genética poblacional del mortiño para el modelo con $K=2$, es posible que haya ocurrido una fragmentación de la población en el período glacial, que dio origen a los dos linajes, los cuales en períodos interglaciares y hacia el final del Pleistoceno entraron en contacto y se mezclaron nuevamente. También es posible que, de no haber ocurrido estas fragmentaciones, el mortiño sea una especie que se esté diversificando recientemente, donde la estructura genética obtenida puede ser producto de una clasificación incompleta de linajes. La conclusión acerca de cuál de estos procesos (o ambos) dio como resultado una estructura genética poblacional de mortiño (Figura 9a) con dos linajes ancestrales, puede ser estimada con una combinación de varias estrategias como un muestreo extensivo (en todas las localidades donde se reporta mortiño en Ecuador), un análisis comparativo de resultados con SSRs, con marcadores para ADN

mitocondrial o de cloroplasto y con métodos de simulación con coalescencia (Qu *et al.*, 2012).

Para el resultado presentado con $K=3$ (Figura 9b), llama la atención el hecho de que las tres agrupaciones encontradas correspondan exactamente a las tres regiones geográficas definidas y utilizadas como información previa para este análisis (Sección 7.5). El uso de varias técnicas de inferencia bayesiana han demostrado tener sus debilidades al momento del desarrollo de análisis e interpretación de sus resultados (Heller *et al.*, 2013). Sin embargo, un análisis detallado de la ubicación geográfica de cada sitio de muestreo (Figura 10) sugiere que el modelo de regiones geográficas propuesto, es efectivamente una descripción objetiva del set de datos analizado. El establecimiento de un set de *priors* (información previa) adecuados representa una ventaja para la inferencia bayesiana, puesto que permite la incorporación explícita de información para la comprobación de una hipótesis (Huelsenbeck *et al.*, 2002). Sin embargo, el efecto de la información previa sobre la distribución del *posterior* será más enfática para sets de datos pequeños y con parámetros no tan claramente definidos (Gelman, 2002). Un análisis más profundo podría establecer la validez del uso de esta información previa.

La presencia de 3 linajes ancestrales que separan a los individuos de mortiño en tres subpoblaciones bien definidas ($K=3$) sugiere un aislamiento por distancia geográfica, donde existen barreras (por ejemplo mesetas sobre las que se localizan ciudades como Quito), que evitan el intercambio genético entre estas tres regiones.

De acuerdo a la historia biogeográfica de las regiones andinas de los neotrópicos, es posible que la diversa población de mortiño presente antes del período Mesozoico

(donde emergieron las barreras montañosas) haya sido fragmentada por los eventos geológicos del Mesozoico, y no hayan vuelto a entrar en contacto desde aquella época (asumiendo que las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno no afectaron a los neotrópicos) (Weir, 2006). Esto explicaría que las localidades de donde provienen los individuos de mortiño de las tres líneas ancestrales compartan alelos (provenientes de un pool genético ancestral común), pero que en la actualidad no tienen intercambio genético unas con otras.

El resultado de la prueba de Mantel confirma la existencia de una moderada correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética de las muestras de mortiño analizadas; con un coeficiente de correlación $r_{xy} = 0.304$ y $P < 0.001$.

Adicionalmente, sería interesante incluir un análisis que correlacione gradientes altitudinales con distancias genéticas, ya que la variación genética dentro de las poblaciones a menudo varía a lo largo de gradientes altitudinales. Se ha encontrado un primer escenario donde las poblaciones de altitud media pueden tener niveles más altos de diversidad en comparación con las poblaciones tanto de baja y alta elevación (Shi *et al.*, 2011). Un segundo escenario donde las poblaciones de poca elevación pueden tener mayor diversidad que disminuye con la altitud, como resultado de los cuellos de botella que se producen en todo el rango de expansión hacia arriba. Y un tercer escenario donde las poblaciones que se encuentran a mayor elevación presentan mayor diversidad genética debido a varias razones como la disminución de las perturbaciones humanas y a la eficiente adaptación de las especies de estas zonas (Ohsawa, 2008). Los procesos que dan lugar a estos patrones, como la deriva génica o los cuellos de botella, son resultado de un conjunto de factores como la temperatura o el uso del suelo en cada región y de los eventos de la historia demográfica de esta región. (Shi *et al.*, 2011)

En el presente estudio, en base a la disimilitud genética de los individuos de mortiño de la localidad de Quilotoa (donde se colectó las muestras a mayor altitud, sobre los 4000 msnm) respecto a las demás localidades, se podría considerar la posibilidad de un aislamiento por altura; sin embargo solo se colectó hojas de 10 individuos de mortiño en esta localidad y, entre alturas de 3700m y 4000m no se colectó muestras de ningún individuo de mortiño. Se sugiere ampliar el muestreo de individuos de mortiño y hacerlo de acuerdo a un gradiente altitudinal para realizar un nuevo análisis de los datos y poder concluir acerca de la presencia de un aislamiento y diferenciación por altura.

Otra hipótesis interesante que podría tener relación con la estructura de tres grupos obtenida en este análisis es el de *Sky Islands*. Con este término se define a las áreas de gran elevación, aisladas geográficamente, y que se ubican en zonas montañosas en el continente (Heald, 1951). Este concepto no ha sido adoptado para las cordilleras andinas, pero existen un sinnúmero de estudios en Estados Unidos, Europa y Asia donde se evidencia que las estructuras filogeográficas de poblaciones de individuos de una *sky island* siguen patrones de aislamiento por elevación y por distancia (He y Jiang, 2014).

Si bien las zonas de los páramos andinos donde se colectó las muestras de mortiño no representan *Sky Islands* (elevaciones que se encuentran en medio de desiertos, con drásticos cambios ambientales en un gradiente altitudinal) por definición, si podrían estar ocurriendo procesos similares como deriva génica y ausencia de intercambio génico entre las 3 regiones geográficas definidas, a causa de barreras físicas como la presencia de valles y cuencas que separan las diferentes montañas de donde provienen los individuos de mortiño de este estudio (He y Jiang 2014).

9. Conclusiones

- Existe un nivel moderado de diversidad genética de mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) (0.42) proveniente de los páramos de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. De esta diversidad encontrada, el 85% corresponde a la diversidad intrapoblacional y el 14% corresponde a la diversidad interpoblacional.
- Se obtuvo 91.67% de transferibilidad de los primers heterólogos utilizados, obtenidos de blueberry.
- No se encontró patrones de distribución geográfica en base a provincias o localidades mediante métodos de distancias genéticas (Fst, PCoA, Neighbor Joining), los individuos de mortiño se distribuyen aleatoriamente excepto por la localidad de Quilotoa que se separa del resto de localidades analizadas.
- Un estimado de la estructura poblacional de mortiño en la región analizada, mediante métodos de inferencia bayesiana sugiere la presencia de dos o de tres líneas ancestrales, de acuerdo a la información previa que se incluya en el software para el análisis.
- Una estructura con la presencia de dos líneas ancestrales que dan lugar a dos grupos genéticos con varias localidades híbridas intermedias, puede ser explicado por procesos de hibridación o de clasificación incompleta de linajes, de acuerdo a la historia biogeográfica y diversificación de los neotrópicos en el Pleistoceno.
- Una posible estructura con la presencia de tres grupos bien definidos sugiere que existen patrones de aislamiento por distancia, donde no existe intercambio genético entre las poblaciones.

10. Recomendaciones

- Extender el análisis a toda la sierra ecuatoriana, incluyendo las otras dos especies de mortiño reportadas en el sur del país. Para este análisis se recomienda realizar un muestreo de acuerdo a gradientes de altura para evaluar si existe o no un aislamiento por elevación.
- Dada la posibilidad de que los microsatélites tienden a saturarse con facilidad, se recomienda utilizar un marcador molecular para la amplificación de una región mitocondrial o de cloroplasto ya que estas regiones son de herencia materna y el análisis de los haplotipos resultantes permite monitorear como se ha dado el proceso evolutivo en una especie a partir de un ancestro común.
- Para posteriores análisis se sugiere utilizar secuencias de regiones de ADN nuclear, de regiones microsatélites, de ADN mitocondrial o de ADN de cloroplastos, para poder realizar comparaciones con bases de datos de especies cercanas a mortiño como es el caso de *Vaccinium meridionale* presente en Colombia y Perú.
- Para definir la estructura poblacional en base a la filogeografía de esta especie se sugiere realizar análisis que incluyan número de migrantes (evaluado con métodos bayesianos), porcentaje de clones existentes en las poblaciones e información acerca de aislamiento genético y de barreras geográficas, para esto se sugiere modelos de simulación en base a métodos de coalescencia.
- Analizar estadísticamente la probabilidad de ocurrencia de hibridación o de clasificación de linajes incompletos en la muestra analizada para fundamentar el resultado encontrado en el caso de dos líneas ancestrales. Este análisis quedó fuera del alcance del presente estudio debido a que se requiere un mayor número

de individuos y de sitios muestreados para inferir sobre la historia evolutiva del mortiño en el Ecuador.

- Investigar en mortiño y en otras especies de *Vaccinium* (*V. meridionale*, *V. crenatum*, entre otras) de las regiones andinas, la presencia de aislamiento por elevación y por distancia, para sustentar la posibilidad de que las regiones montañosas de los andes siguen un modelo de *Sky Islands*.

11. Referencias

- Ausubel, FM, Brent, R, Kingston, RE, Moore, DD, Seidman, JG, Smith, JA, Struhl, K. (2003) *Current Protocols in Molecular Biology*. Ringbou Edition. John Wiley & Sons Inc.
- Avise, J. (2000) *Phylogeography: The History and Formation of Species*. President and Fellows of Harvard College. ISBN 0-674-66638-0.
- Ballington, J.R., Luteyn, J.L., Thompson, M.M., Romoleroux, K. & Castillo, R. (1993) *Rubus and vacciniaceous germplasm resources in the Andes of Ecuador*. *Plant Genetic Resources Newsletter* 93: 9-15.
- Bassil N, Oda A, Hummer KE (2009) Blueberry microsatellite markers identify cranberry cultivars. *Acta Horti* 810:181–187
- Bell D, Rowland LJ, Polashock J, Drummond F (2008) Suitability of EST-PCR markers developed in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) for genetic fingerprinting and relationship studies in lowbush blueberry (*V. angustifolium* Ait.). *J Am Soc Horti Sci* 133:701–707
- Benbouza, Halima. (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 10 (2) P 77-81
- Blanco-Pastor JL, Vargas P, Pfeil BE (2012) Coalescent simulations reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean *Linaria*. *PLoS One*, 7, e39089.
- Boches P, Rowland LJ, Bassil NV (2005) Microsatellite markers for *Vaccinium* from EST and genomic libraries. *Mol Ecol Notes* 5:657–660
- Boches P, Rowland LJ, Hummer KE, Bassil NV (2006) Microsatellite markers evaluate genetic diversity in blueberry and generate unique fingerprints. In: *Plants and animal genome XIV conference*, San Diego, CA, USA, p 133
- Bosnian, A.F. van der Molen, P.C., Young, R. & Cleef, A.M. (2009) Ecology of a paramo cushion mire. *Journal of Vegetation Science* 4(5): 633-640.

- Bruederle LP, Hagan MS, Dignan JM, Vorsa N (1996) Genetic variation in natural populations of the large cranberry, *Vaccinium macrocarpon* Ait. (Ericaceae). *B Torr Bot Club* 123:41–47
- Carstens BC, Knowles LL (2007) Shifting distributions and speciation: species divergence during rapid climate change. *Molecular Ecology*, 16, 619–627.
- Cornide M.T., (2000) Diversidad genética y marcadores moleculares. CNIC, La Habana, p 180.
- Chaparro de Valencia, M.L. & Becerra de Lozano, N. (1999) Anatomía del fruto de *Vaccinium floribundum* (Ericaceae). *Acta Biológica Colombiana* 4(1): 47-60.
- Cho YG, Ishii T, Temnykh S, Chen X, Lipovich L, McCouch SR, Park WD, Ayres N, Cartinhour S (2000) Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet* 100:713-722
- Cubero. Jose. (2002) Introducción a la Mejora Genética Vegetal. Mundi Prensa. Madrid pp 70-80
- Debnath, Samir C. (2006) Influence of indole 3- butyric acid and propagation method of growth and development of in vitro and ex vitro derived lowbush blueberry plants. *Plant Growth Regulation*. Vol.51, Issue 3 (March), 245-253.
- DeWoody, J., V.D. Hipkins, J.K. Nelson, and L.Linstrand III. (2012) Genetic Structure of *Vaccinium parvifolium* (Ericaceae) in Northern California Reveals Potential Systematic Distinctions. *Madroño*, 59(4):196-210.
- Ellis JR, Burke JM. (2007). EST-SSRs as a resource for population genetic analyses. *Heredity*. 99:125–132.
- Evanno, G, S. Regnaut, and J. Goudet. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611 – 2620.
- Finn C. (1999) Temperate berry crops. In: Janick J (ed) *Perspectives on new crops and new uses*. ASHS, Alexandria, VA, pp 324–334

- Garzón, G. Narváez, C. Riedl, K y S. Schwartz (2010) Chemical composition, anthocyanins, non anthocyanin phenolics and antioxidant activity of wild bilberry (*Vaccinium meridionale* Swartz) from Colombia. *Journal of food chemistry* 122: 980-986.
- Galletta GJ, Ballington JR (1996) Blueberries, cranberries and lingonberries. In: Janick J, Moore JN (eds) *Fruit breeding, vol II, Vine and small fruit crops*. Wiley, New York, NY, pp 1–107
- Haffer, J., and G. T. Prance. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana* 16:579–605.
- Hamada H, Kakanuga T (1982) Potential Z-forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298:396-398
- Hancock JF, Lyrene P, Finn CE, Vorsa N, Lobos GA (2008) Blueberries and cranberries. In: Hancock JF (ed) *Temperate fruit crop breeding*. Springer, New York, NY, pp 115–149
- Heald W (1951) Sky islands of Arizona. *Nat Hist* 60:56–63
- Heller, R., Chikhi, L. & Siegmund, H.R. (2013) The Confounding Effect of Population Structure on Bayesian Skyline Plot Inferences of Demographic History. *PLoS One* 8(5): e32992.
- Henry, Robert. (2013) *Molecular Markers in Plants*. Wiley Blackwell. Iowa, United States. pp 3-10
- Herbario QCA. (2006) Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Escuela de Ciencias Biológicas.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58, 247–276.
- Hinrichsen P, Herminia Castro M, Ravest G, Rojas G, Méndez M, Bassil NV, Muñoz C (2009) Minimal microsatellite marker panel for fingerprinting blueberry cultivars. *Acta Horti* 810:173–180

- Hoelzer GA (1997) Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-genes trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51, 622–626.
- Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resources* 9: 1322–1332.
- Huelsenbeck, J.P., Larget, B., Miller, R.E. & Ronquist, J. (2002). Potential Applications and Pitfalls of Bayesian Inference of Phylogeny. *Syst. Biol.* 51(5): 673-688.
- Iwagaki H, Ishikawa S, Tamada T, Koike H (1977) The present status of blueberry work and wild *Vaccinium* spp. in Japan. *Acta Hortic* 61:331–334
- Jakobsson M, Rosenberg NA (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23: 1801–1806.
- Kole C. (2011) Wild crop relatives: genomic and breeding resource cereals. Institute of Natural Research. Chapter 10: 197-218
- Kron KA, Powell EA, Luteyn JL (2002) Phylogenetic relationships within the blueberry tribe (Vaccinieae, Ericaceae) based on sequence data from MATK and nuclear ribosomal ITS regions, with comments on the placement of *Satyria*. *Am J Bot* 89:327–336
- Li Y, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol* 11:2453-2465
- Li SH, Yeung CKL, Feinstein J *et al.* (2009) Sailing through the Late Pleistocene: unusual historical demography of an East Asian endemic, the Chinese Hwamei (*Leucodiotron canorum canorum*), during the last glacial Period. *Molecular Ecology*, 18, 622–633.
- Lyrene PM, Vorsa N, Ballington NR (2003) Polyploidy and sexual polyploidization in the genus *Vaccinium*. *Euphytica* 133:27–36
- Luby JJ, Ballington JR, Draper AD, Pliska K, Austin ME (1991) Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). In: Moore JN, Ballington JR (eds) Genetic resources

- of temperate fruit and nut crops. International Society for Horticultural Science, Wageningen, Netherlands, pp 391–456
- Luteyn, James L. (2002) “Diversity, Adaptation, and Endemism in Neotropical Ericaceae: Biogeographical Patterns in the Vaccinieae.” *The Botanical Review* 68.1 55-87.
- McDonald, D.B., and W.K. Potts. (1997) Microsatellite DNA as a genetic marker at several scales. pp. 29-49 In *Avian Molecular Evolution and Systematics* (D. Mindell, ed.). Academic Press, New York
- Michalakis, Y., and L. Excoffier. (1996) A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064.
- Miesfield R, Krystal M, Amheim NA (1981) A member of a new sequence family which is conserved throughout eucaryotic evolution is found between the human 8- and p-globin genes. *Nucleic Acids Res* 9:5931-5947.
- Morando M, Avila LJ, Baker J, Sites JW Jr. (2004) Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58: 842–861.
- Moscol Olivera, M.C. & Cleef, A.M. (2009). A phytosocial study of the páramo along two altitudinal transects in El Carchi Province, northern Ecuador. *Phytocoenología* 39(1): 79-107.
- National Research Council. *Lost Crops of the Incas: Little known plants of the Andes with Promise for Worldwide Cultivation*. Washington DC: The National Academies Press, 1989.
- Ohsawa T, Ide Y (2008) Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography* 17: 152–163.
- Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton, and P.A. Fuerst (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using molecular markers. *Ecology* 79: 361-382.

- Peakall R, Smouse P (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*.
- Perrier, X & Jacquemoud-Collet, JP. (2006). DARwin software. <http://darwin.cirad.fr/>
- Persson HA, Gustavsson BA (2001) The extent of clonality and genetic diversity in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) revealed by RAPDs and leaf-shape analysis. *Mol Ecol* 10:1385–1397
- Powell EA, Kron KA (2002) Hawaiian blueberries and their relatives-A phylogenetic analysis of *Vaccinium* sections *Macropelma*, *Myrtillus*, and *Hemimyrtillus* (*Ericaceae*). *Syst Bot* 27:768–779
- Primack, R. (2006) *Essentials of conservation biology*. 4 ed. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 – 959.
- Qu YH, Luo X, Zhang RY, Song G, Zou FS, Lei FM (2011) Lineage diversification and historical demography of a montane bird *Garrulax elliotii*—implications for the Pleistocene evolutionary history of the eastern Himalayas. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 174.
- Qu Y, Zhang R, Quan Q, Song G, Li SH, et al. (2012) Incomplete lineage sorting or secondary admixture: disentangling historical divergence from recent gene flow in the Vinous-throated parrotbill (*Paradoxornis webbianus*). *Mol Ecol* 21: 6117–6133.
- Ramsay, P.M. & Oxley, E.R.B. (1996) Fire temperatures and postfire plant community dynamics in Ecuadorian grass páramo. *Vegetatio* 124: 129-144.
- Rogers and A.M. Montalvo (2004) Genetically appropriate choices for plant materials to maintain biological diversity D.L.. University of California. Report to the USDA Forest Service, Rocky Mountain Region, Lakewood, CO. Online
- Roldán, S. F. (2012) Caracterización molecular, funcional y estudio del comportamiento post cosecha del mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) de la

comunidad de Quinticusig del cantón Sigchos de la provincia de Cotopaxi. Tesis de Ingeniería Agroindustrial no publicada, EPN, Quito, Ecuador.

- Rosenberg, N. A., J. K. Pritchard, J. L. Weber, H. M. Cann, K. K. Kidd, L. A. Zhivotovsky, and M. W. Feldman. (2002). Genetic structure of human populations. *Science* 298: 2381 – 2385.
- Rowland L, SmritiM DA, Ehlenfeldt M, Ogden E, Slovin J (2003) Development of ESTPCR markers for DNA fingerprinting and mapping in blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). *J Am Soc Hortic Sci* 128:682–690
- Saghai-Marooif M. A., K. M. Soliman. A. Jorgensen and R. W. Allard, (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 8014-8019.
- Sarwar, A.K.M. Golam, Ito, T. & Takahashi, H. (2006). An overview of pollen morphology and its systemic significance in *Vaccinium* L. (Ericaceae). Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers: HUSCAP: 35pp.
- Schreckinger, M.E. Wang, J. Yousef, G, M. L. y Gonzalez, E. (2010). Antioxidant Capacity and in vitro Inhibition of Adipogenesis and Inflammation by Phenolic Extracts of *Vaccinium floribundum* and *Aristotelia chilensis*. *Journal of Agricultural and food chemistry*. 58: 8966-8976.
- Shi MM, Michalski SG, Chen XY, Durka W (2011) Isolation by elevation: genetic structure at neutral and putatively non-neutral loci in a dominant tree of subtropical forests, *Castanopsis eyrei*. *Plos One* 6. doi: 10.1371
- Spehn, E.M., Liberman, M. & Korner, C. (2006). *Land Use Change and Mountain Biodiversity*. CRC Press,.
- Tang S, Knapp S (2003) Microsatellites uncover extraordinary diversity in native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor Appl Genet* 106:990-1003.

- Vander Kloet SP (1988) The genus *Vaccinium* in North America. Pub 1828. Res Branch, Agri Canada, Canadian Government Publication Centre, Ottawa, ON, Canada
- Vasco, C. Riihinen, J. Ruales y A. Kamal-Eldin. (2009). Chemical composition and phenolic compound profile of mortiño (*Vaccinium floribundum* Kunth) J. Agric. Food Chem. 57: 8274-8281.
- Weir, J.T. (2006). Divergent timing and patterns of species accumulation in lowland and highland neotropical birds. *Evolution*, 60, 842–855.
- Young SB (1970) On the taxonomy and distribution of *Vaccinium uliginosum*. *Rhodora* 72:439–459
- Zhao,C.Giusti, M. Malik, M. MomOyer, M. y B. Magnuson. (2004). Effects of comercial anthocyanin rich extracts on colon cancer and non tumorigenic colonic cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 6122-6128.

12. Tablas

Tabla 1. Resumen de la información proporcionada por los 11 marcadores tipo microsatélites analizados: temperatura de annealing, número y rango de tamaño de los alelos encontrados en 126 muestras de mortiño procedentes de la sierra ecuatoriana.

Nº	Locus	GenBank	Secuencia de los primers	T °C	Nº de alelos	Tamaño alelos (pb)
1	CA421F	CF810704	F: 5'-TCAAATTCAAAGCTCAAAATCAA-3' R: 5'-GTTTAAGGATGATCCCGAAGCTCT-3'	60	4	168-214
2	NA1040	CF811165	F: 5'-GCAACTCCCAGACTTTCTCC-3' R: 5'-GTTTAGTCAGCAGGGTGCACAA-3'	61	11	186-255
3	CA344F	CF810639	F: 5'-TTACCAAACGCCTCTCCAC-3' R: 5'-GTTTCTTCCTTACGCCCTGAAAT-3'	60	2	160-166
4	CA794F	CF810941	F: 5'-CGGTTGTCCCACTTCATCTT-3' R: 5'-GTTTGAATTTGGCTTCGGATTC-3'	60	14	224-255
5	CA112F	CF810443	F: 5'-TCCACCCACTTCACAGTTCA-3' R: 5'-GTTTATTGGGAGGGAATTGGAAAC-3'	60	5	167-182
6	CA787F	CF810934	F: 5'-TCCTCGTTCTCTCCCTCTCA-3' R: 5'-GTTTCGCTGAAGTTGGAGTCCTT-3'	60	1	302
7	CA855F	CF811000	F: 5'-CGCGTGAAAAACGACCTAAT-3' R: 5'-GTTTACTCGATCCCTCCACCTG-3'	64	3	218-235
8	NA41	CF811380	F: 5'-TTCCTTTAGTCGCGTCATCA-3' R: 5'-GTTTAAGGTCGCTACGAGACTCCA-3'	64	8	195-210
9	NA800	CF811589	F: 5'-CAATCCATTCCAAGCATGTG-3' R: 5'-GTTTCCCTAGACCAGTGCCACTTA-3'	61	9	196-216
10	NA961	CF811674	F: 5'-TCAGACATGATTGGGGAGGT-3' R: 5'-GTTTGGAATAATAGAGGCGGTGGA-3'	60	3	160-190
11	VCC_B3	AY842445	F: 5'-CCTTCGATCTTGTTCCCTTGC-3' R: 5'-GTTTGATGCAATTGAGGTGGAGA-3'	62	3	210-220

Datos tomados de Boches *et al.*, 2005. La temperatura de annealing °C, el número de alelos y el tamaño de los alelos reportados son los resultados encontrados para mortiño en el presente estudio.

Tabla 2. Resumen de datos de colección de muestras de mortiño, extracción de ADN y número de alelos encontrados en los 11 loci analizados

Provincia	Total muestras colectadas	Total muestras ADN extraídas	Cuantificación de ADN (rango en ng/ul)	# total de alelos identificados	# de alelos exclusivos observados
Imbabura	43	43	21.23-283.57	46	3
Pichincha	43	41	91.42-753.02	53	5
Cotopaxi	43	42	133.97-567.53	48	4

Tabla 3. Resumen de parámetros de diversidad genética de mortiño obtenidos para cada localidad con el uso de GenAlEx 6.501. (Promedio \pm desviación estándar)

Provincia	Localidad	Na	Ne	I	Ho	He	F
	San Pablo	2.91 \pm 0.51	1.86 \pm 0.25	0.65 \pm 0.15	0.32 \pm 0.07	0.36 \pm 0.08	0.08 \pm 0.07
Imbabura	Cashaloma	3.36 \pm 0.64	2.06 \pm 0.27	0.78 \pm 0.16	0.42 \pm 0.09	0.42 \pm 0.08	0.01 \pm 0.09
	Cotacahi-Cayapas	3.18 \pm 0.63	1.95 \pm 0.3	0.68 \pm 0.18	0.29 \pm 0.07	0.36 \pm 0.09	0.13 \pm 0.06
	P. N. Cotopaxi-Norte	2.73 \pm 0.47	1.95 \pm 0.33	0.65 \pm 0.16	0.42 \pm 0.09	0.36 \pm 0.08	-0.20 \pm 0.08
Pichincha	Ilinizas	3.73 \pm 0.71	2.56 \pm 0.52	0.87 \pm 0.20	0.45 \pm 0.11	0.44 \pm 0.09	0.04 \pm 0.11
	Mojanda	3.45 \pm 0.68	2.25 \pm 0.40	0.79 \pm 0.18	0.38 \pm 0.08	0.42 \pm 0.09	0.06 \pm 0.08
	P. N. Cotopaxi-Sur	3.45 \pm 0.74	2.22 \pm 0.41	0.76 \pm 0.19	0.39 \pm 0.09	0.40 \pm 0.09	0.02 \pm 0.05
Cotopaxi	Sigchos	3.27 \pm 0.73	2.01 \pm 0.31	0.72 \pm 0.18	0.41 \pm 0.10	0.38 \pm 0.09	-0.10 \pm 0.1
	Quilotoa	1.82 \pm 0.38	1.26 \pm 0.16	0.24 \pm 0.12	0.08 \pm 0.04	0.13 \pm 0.07	0.15 \pm 0.12

Na número promedio de alelos observados por locus; *Ne* número promedio de alelos efectivos observados por locus; *I* índice de Shannon; *Ho* heterocigocidad observada; *He* heterocigocidad esperada; *F* índice de fijación.

Tabla 4. Resumen de parámetros de diversidad genética de mortiño obtenidos con el uso de GenAlEx 6.501. (Promedio \pm desviación estándar)

Provincia	Na	Ne	I	Ho	He	F
Imbabura	4.18 \pm 0.932	2.07 \pm 0.321	0.77 \pm 0.182	0.33 \pm 0.07	0.40 \pm 0.08	0.12 \pm 0.04
Pichincha	4.82 \pm 1.10	2.76 \pm 0.62	0.94 \pm 0.22	0.41 \pm 0.08	0.46 \pm 0.09	0.12 \pm 0.08
Cotopaxi	4.36 \pm 0.98	2.40 \pm 0.51	0.83 \pm 0.21	0.33 \pm 0.08	0.41 \pm 0.09	0.16 \pm 0.07
Promedio	4.46 \pm 0.57	2.41 \pm 0.28	0.85 \pm 0.18	0.36 \pm 0.04	0.42 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04

Na número promedio de alelos observados por locus; *Ne* número promedio de alelos efectivos observados por locus; *I* índice de Shannon; *Ho* heterocigocidad observada; *He* heterocigocidad esperada; *F* índice de fijación.

Tabla 5. Matriz de distancias genéticas de Nei entre individuos de mortiño provenientes de las 9 localidades muestreadas.

		Imbabura			Pichincha			Cotopaxi		
		Cashaloma	San Pablo	Cotacachi Cayapas	Cotopaxi Norte	Ilinizas	Mojanda	Cotopaxi Sur	Sigchos	Quilotoa
Imbabura	Cashaloma	0.000	---	---	---	---	---	---	---	---
	San Pablo	0.017	0.000	---	---	---	---	---	---	---
	Cotacachi Cayapas	0.018	0.044	0.000	---	---	---	---	---	---
Pichincha	Cotopaxi Norte	0.073	0.049	0.056	0.000	---	---	---	---	---
	Ilinizas	0.117	0.089	0.084	0.045	0.000	---	---	---	---
	Mojanda	0.052	0.111	0.075	0.135	0.141	0.000	---	---	---
Cotopaxi	Cotopaxi Sur	0.043	0.036	0.023	0.019	0.062	0.100	0.000	---	---
	Sigchos	0.130	0.142	0.131	0.108	0.059	0.109	0.102	0.000	---
	Quilotoa	0.367	0.403	0.320	0.277	0.336	0.293	0.226	0.253	0.000

El rango de distancias genéticas de Nei va de 0-1. Donde 0 representa identidad absoluta y 1 representa distancia absoluta.

Tabla 6. Matriz de distancias genéticas de Wright (*F_{st}*) entre individuos de mortiño provenientes de las 9 localidades muestreadas.

		Imbabura			Pichincha			Cotopaxi		
		Cashaloma	San Pablo	Cotacachi Cayapas	Cotopaxi Norte	Ilinizas	Mojanda	Cotopaxi Sur	Sigchos	Quilotoa
Imbabura	Cashaloma	0.000	---	---	---	---	---	---	---	---
	San Pablo	0.029	0.000	---	---	---	---	---	---	---
	Cotacachi Cayapas	0.030	0.047	0.000	---	---	---	---	---	---
Pichincha	Cotopaxi Norte	0.061	0.052	0.050	0.000	---	---	---	---	---
	Ilinizas	0.077	0.062	0.061	0.050	0.000	---	---	---	---
	Mojanda	0.044	0.072	0.065	0.088	0.083	0.000	---	---	---
Cotopaxi	Cotopaxi Sur	0.044	0.039	0.031	0.026	0.049	0.071	0.000	---	---
	Sigchos	0.085	0.088	0.092	0.085	0.046	0.078	0.071	0.000	---
	Quilotoa	0.271	0.282	0.257	0.250	0.227	0.236	0.198	0.239	0.000

Valores en el rango entre 0 y 0.05 sugieren baja diferenciación genética; valores presentes dentro del rango entre 0.05 y 0.15 sugieren moderada diferenciación genética; valores entre 0.15 y 0.25 sugieren alta diferenciación genética; y valores superiores a 0.25 sugieren diferenciación genética muy alta. (Wright, 1978 y Hartl & Clark, 1997).

Nota: La interpretación como valores absolutos puede no ser representativa de la diferenciación poblacional real.

Tabla 7. Valores para estimación de la K óptima (método Evano *et al.*, 2005) a partir del análisis en Structure con información previa de localidad y provincia de origen de las muestras de mortino.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	 Ln''(K) 	Delta K
1	15	-2622.29	0.54	-----	-----	-----
2	15	-2457.10	3.40	165.19	108.49	31.89
3	15	-2400.40	8.34	56.70	11.65	1.396
4	15	-2355.35	92.52	45.05	-----	-----

K: número de agrupaciones probado. Reps: número de repeticiones realizadas para el K probado. Media LnP(K): valor promedio del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. Stdev LnP(K): Desviación estándar del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. Ln'(K) derivada de primer orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K. |Ln''(K)|: derivada de segundo orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K. Delta K: Tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos entre valores sucesivos de K.

Tabla 8. Valores para estimación de la K óptima (método Evano *et al.*, 2005) a partir del análisis en Structure con información previa de localidad y región geográfica de origen de las muestras de mortino.

K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	 Ln''(K) 	Delta K
2	15	-2453.87	2.20	-----	-----	-----
3	15	-2355.53	3.24	98.34	47.18	14.58
4	15	-2304.37	24.12	51.16	-----	-----

K: número de agrupaciones probado. Reps: número de repeticiones realizadas para el K probado. Media LnP(K): valor promedio del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. Stdev LnP(K): Desviación estándar del logaritmo natural de la probabilidad estimada de los datos dado un valor de K. Ln'(K) derivada de primer orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K. |Ln''(K)|: derivada de segundo orden de la probabilidad estimada de los datos, dado un valor de K. Delta K: Tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos entre valores sucesivos de K.

13. Figuras

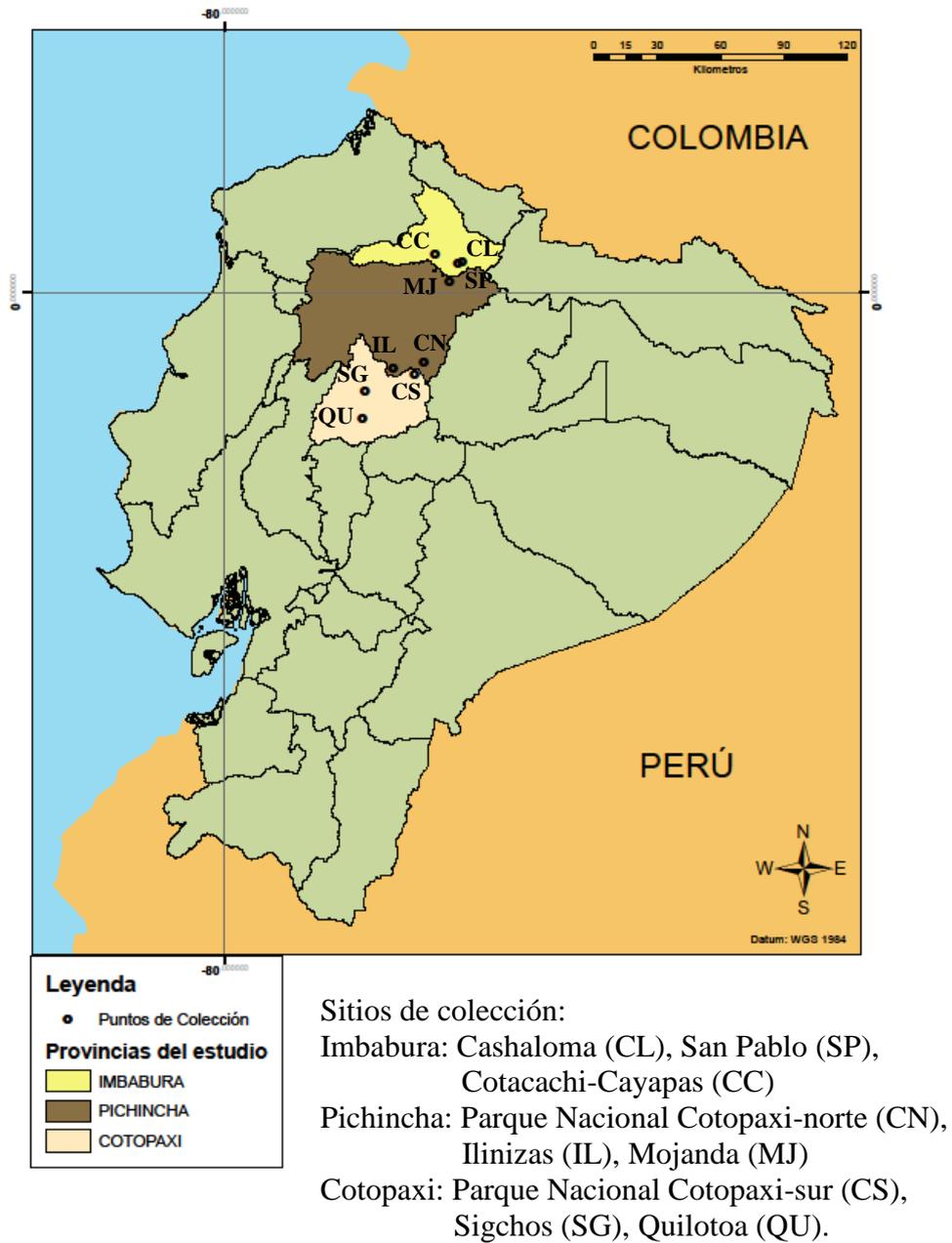


Figura 1. Mapa del Ecuador donde se observa las Provincias en estudio (Imbabura, Pichincha y Cotopaxi) y los sitios de colección de muestras de mortño dentro de cada provincia.

Mapa elaborado por Gabriel Muñoz.

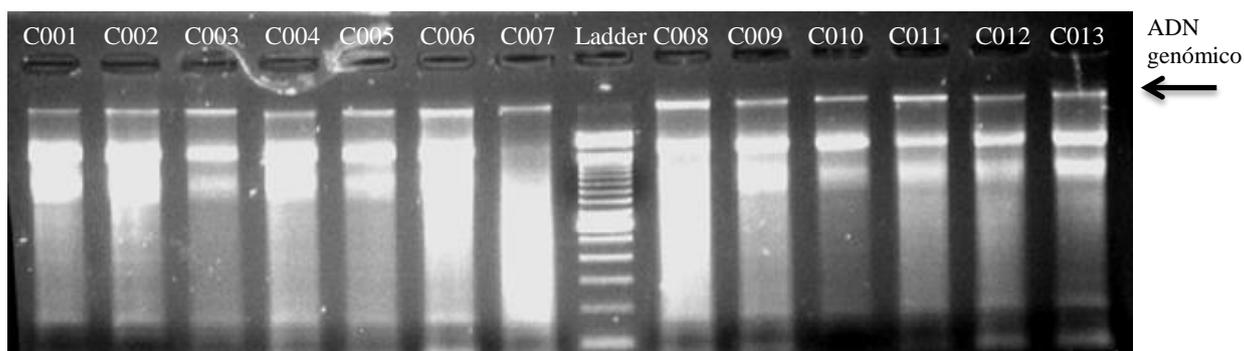


Figura 2. Electroforesis en gel agarosa al 1.5% de muestras de ADN extraído a partir de hojas de mortiño de Cotopaxi. Se observa ADN de alto peso molecular en todas las muestras (C001-C013). Ladder: marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen).

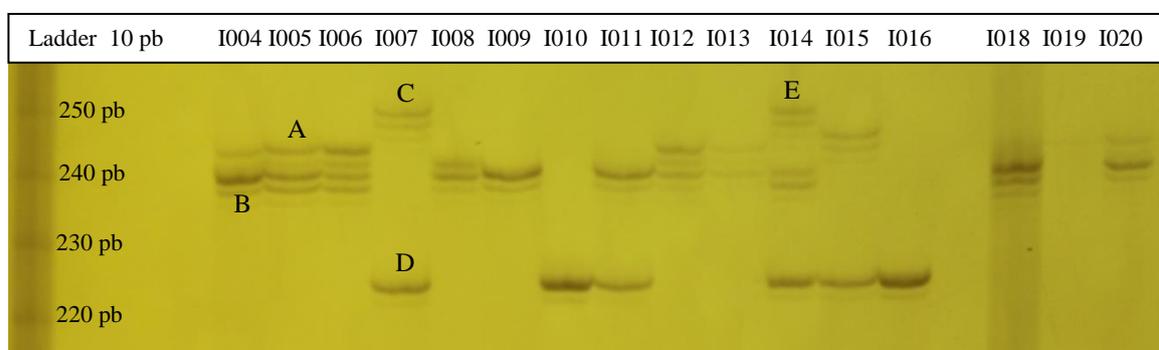


Figura 3. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 16 muestras de ADN de mortiño usando el primer CA794F. Se observa 5 alelos en las muestras analizadas (A-E). El ladder utilizado es 10bp de Invitrogen y los alelos se encuentran en un rango entre 224 y 255 pares de bases.

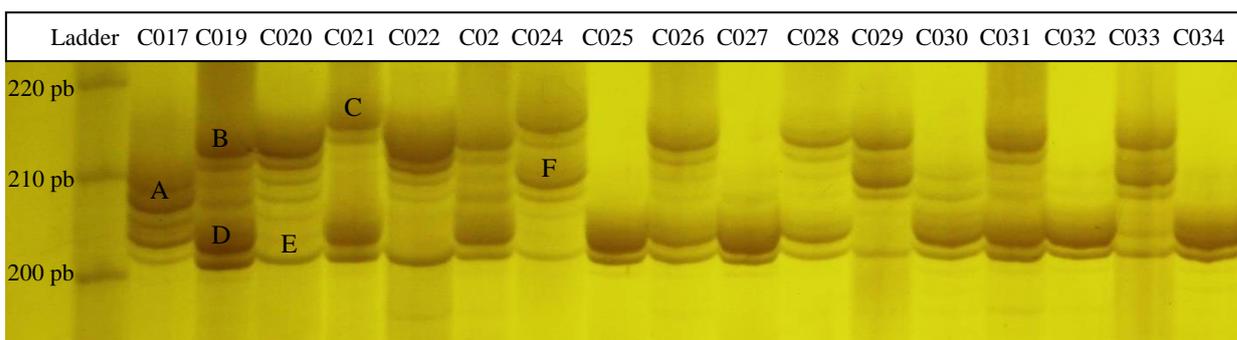


Figura 4. Electroforesis en gel de acrilamida al 6% de los productos de amplificación de regiones microsatélite de 17 muestras de ADN de mortiño usando el primer NA800. Se observa 6 alelos en las muestras analizadas (A-F). El ladder utilizado es 10bp de Invitrogen y los alelos se encuentran en un rango entre 196 y 216 pares de bases.

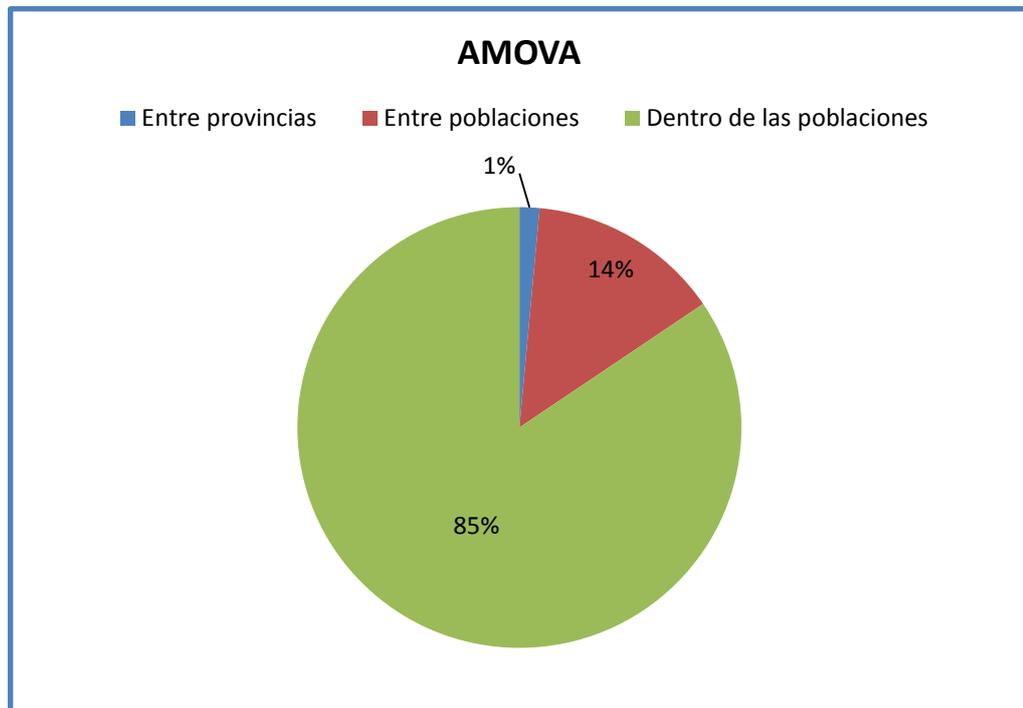


Figura 5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) representada en función de la distribución de la diversidad genética de mortiño entre provincias, entre poblaciones y dentro de las poblaciones. Variación entre provincias indica la variabilidad genética encontrada al comparar individuos de mortiño de Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. La variación entre poblaciones representa la diferenciación genética de los individuos de mortiño entre las 9 localidades muestreadas. La variación dentro de las poblaciones indica la diferenciación genética de los individuos de mortiño dentro de cada una de las 9 poblaciones en estudio, es decir, entre los individuos.

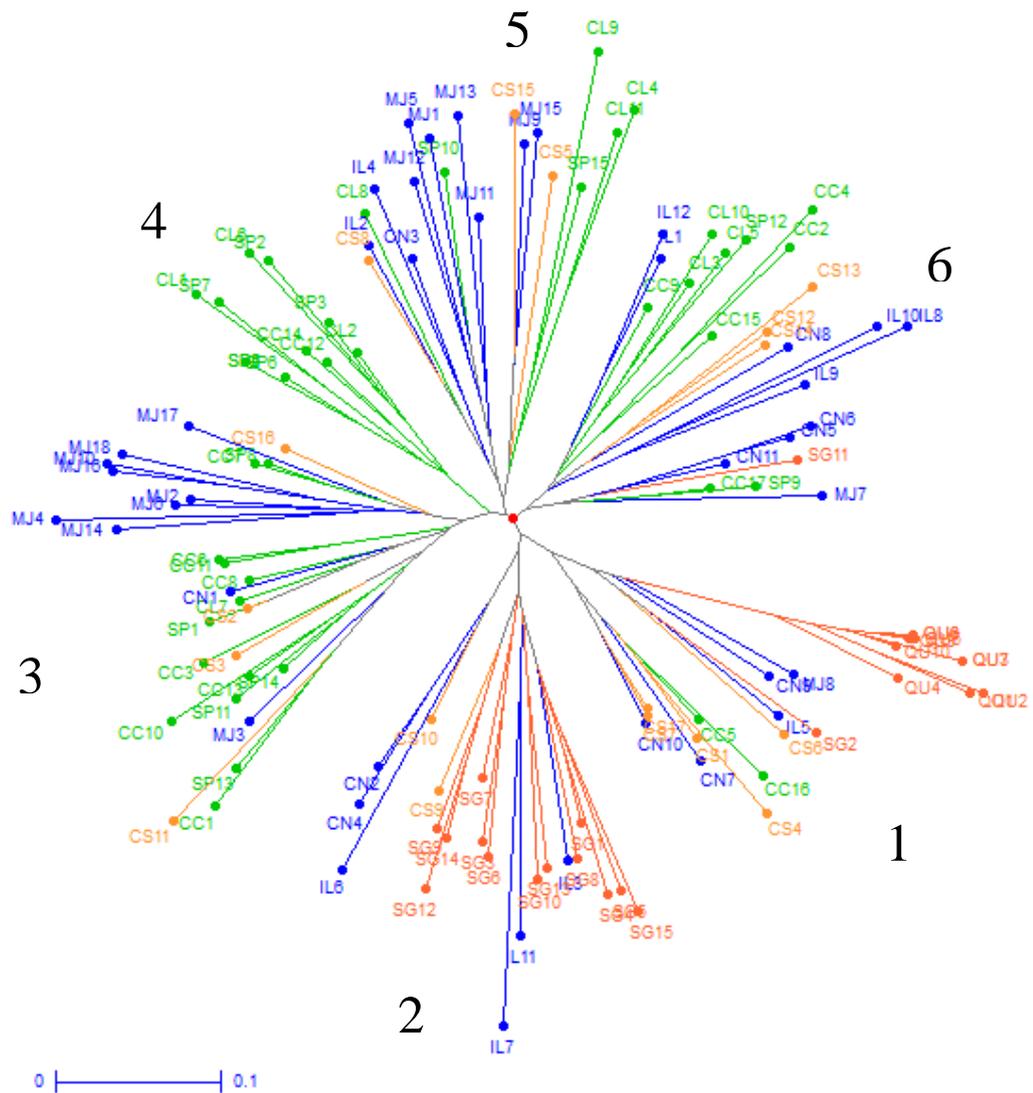


Figura 6. Dendrograma obtenido mediante el método Neighbor Joining con las 126 muestras de mortiño de tres provincias de la sierra ecuatoriana. Se observa en color verde los individuos de Imbabura, en color azul los individuos de Pichincha y en color naranja los individuos de Cotopaxi. Se observa 6 grupos separados, 4 de éstos con individuos mezclados de todas las localidades. Un grupo tiene individuos solo de la provincia de Imbabura (grupo 4) y un subgrupo del grupo 1 separa a todos los individuos de Quilotoa

Código de las localidades: Cashaloma (CL), San Pablo (SP), Cotacachi-Cayapas (CC) Parque Nacional Cotopaxi-norte (CN), Ilinizas (IL), Mojanda (MJ) Cotopaxi: Parque Nacional Cotopaxi-sur (CS), Sigchos (SG), Quilotoa (QU).

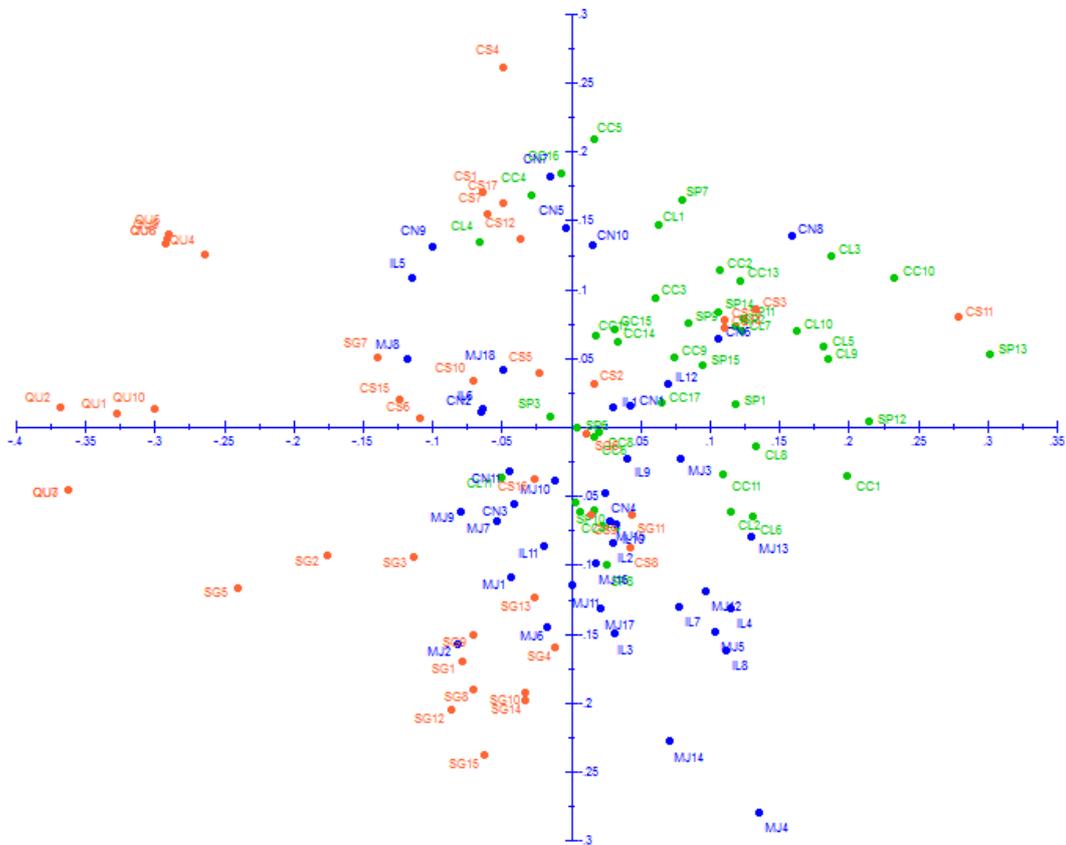


Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido a partir de una matriz de disimilitud con 126 muestras de mortiño de 3 provincias de la sierra ecuatoriana (Verde, Imbabura; Azul, Pichincha; Naranja, Cotopaxi). Todos los individuos se encuentran dispersos en el plano, sin una separación clara, con excepción de la localidad de Quilotoa que se separa en el cuadrante derecho (superior y medio).

Código de las localidades: Cashaloma (CL), San Pablo (SP), Cotacachi-Cayapas (CC) Parque Nacional Cotopaxi-norte (CN), Ilinizas (IL), Mojanda (MJ) Cotopaxi: Parque Nacional Cotopaxi-sur (CS), Sigchos (SG), Quilotoa (QU).

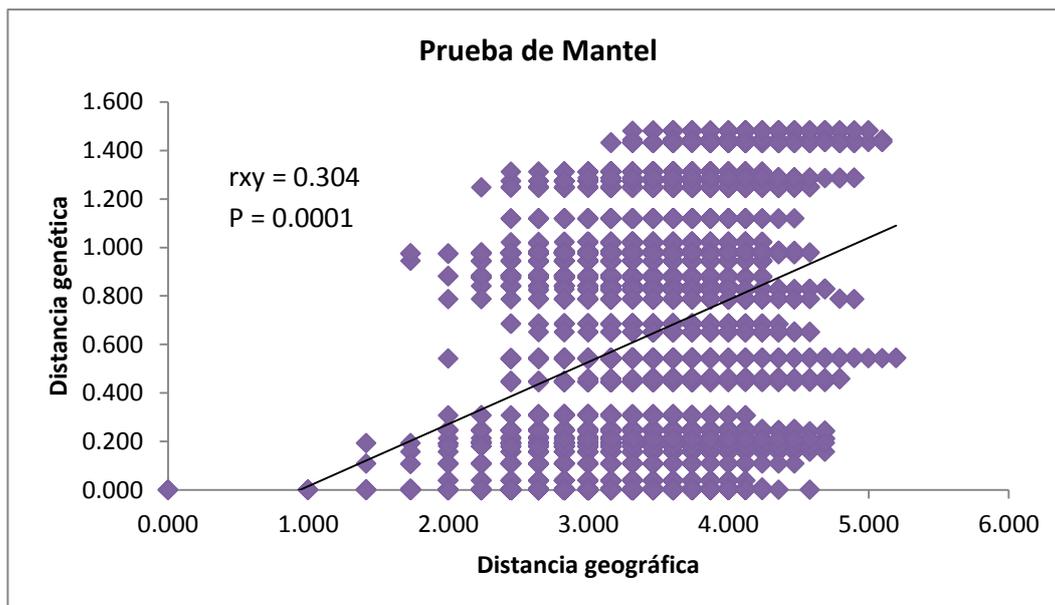


Figura 8. Gráfico de dispersión para evaluar la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica de cada par de individuos de mortiño de la muestra en estudio, mediante una prueba de Mantel pareada. r_{xy} : coeficiente de correlación. P: significancia.

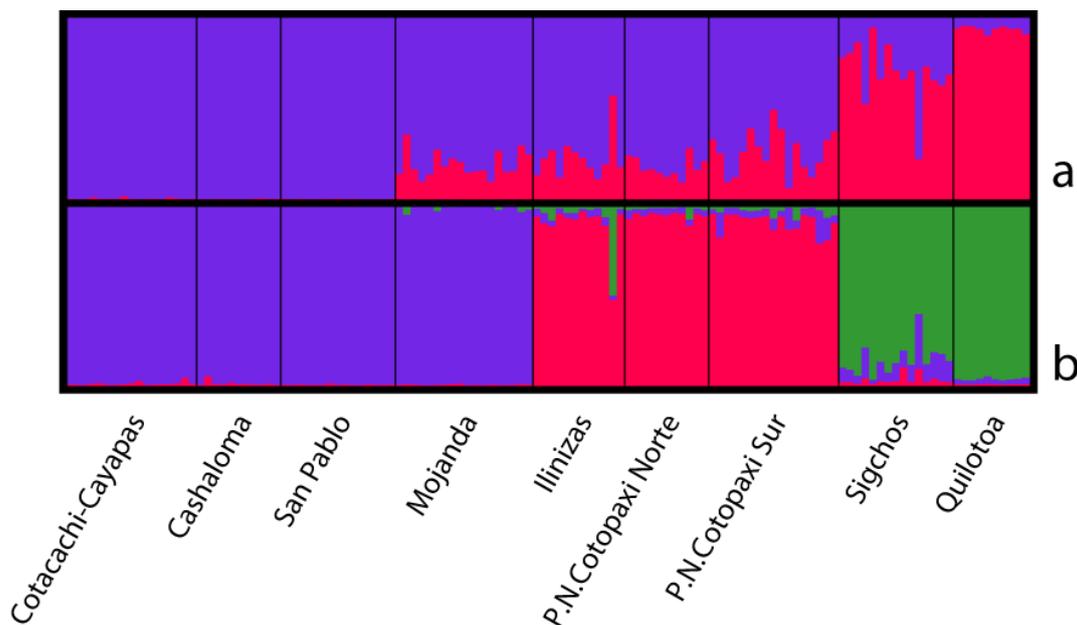


Figura 9. Gráfico de asignación de ancestro para los individuos de mortiño de 9 localidades en tres provincias de la sierra ecuatoriana. a. Resultado del análisis que incluye localidad y provincia como información previa, obteniendo un valor óptimo de $K=2$. b. Resultado del análisis que incluye localidad y región geográfica como información previa, obteniendo un valor óptimo de $K=3$.

14. Anexos

Anexo I. Muestras de hojas de mortiño colectadas en Imbabura, Pichincha y Cotopaxi. Se indica la localidad, el código de la muestra, las coordenadas geográficas y la altitud de los sitios de colección.

IMBABURA			
Localidad	No. muestra	Coordenadas	Altitud
Lago San Pablo - Faldas del Imbabura	I001	N0 14.021 W78 10.620	3413 msnm
	I002	N0 14.022 W78 10.618	3412 msnm
	I003	N0 14.022 W78 10.616	3416 msnm
	I004	N0 14.022 W78 10.615	3419 msnm
	I005	N0 14.028 W78 10.614	3423 msnm
	I006	N0 14.029 W78 10.612	3426 msnm
	I007	N0 14.030 W78 10.616	3421 msnm
	I008	N0 14.035 W78 10.627	3418 msnm
	I009	N0 14.035 W78 10.628	3418 msnm
	I010	N0 14.033 W78 10.627	3417 msnm
	I011	N0 14.033 W78 10.625	3418 msnm
	I012	N0 14.031 W78 10.625	3417 msnm
	I013	N0 14.030 W78 10.626	3416 msnm
	I014	N0 14.021 W78 10.625	3407 msnm
	I015	N0 14.017 W78 10.624	3405 msnm
Cashaloma	I016	N0 15.554 W78 08.793	3298 msnm
	I017	N0 15.553 W78 08.793	3301 msnm
	I018	N0 15.553 W78 08.793	3302 msnm
	I019	N0 15.551 W78 08.796	3307 msnm
	I020	N0 15.551 W78 08.801	3310 msnm
	I021	N0 15.551 W78 08.804	3313 msnm
	I022	N0 15.550 W78 08.806	3312 msnm
	I023	N0 15.543 W78 08.822	3325 msnm
	I024	N0 15.531 W78 08.810	3312 msnm
	I025	N0 15.544 W78 08.798	3314 msnm
	I026	N0 15.547 W78 08.802	3314 msnm
Reserva EcológicaCotacachi - Cayapas	I027	N0 18.585 W78 21.020	3326 msnm
	I028	N0 18.598 W78 21.031	3323 msnm
	I029	N0 18.659 W78 21.136	3330 msnm
	I030	N0 18.672 W78 21.163	3334 msnm
	I031	N0 18.744 W78 21.221	3378 msnm
	I032	N0 18.745 W78 21.219	3370 msnm
	I033	N0 18.778 W78 21.166	3395 msnm
	I034	N0 18.775 W78 21.139	3401 msnm

	I035	N0 18.779 W78 21.133	3396 msnm
	I036	N0 18.903 W78 21.091	3443 msnm
	I037	N0 18.893 W78 21.099	3442 msnm
	I038	N0 18.895 W78 21.121	3439 msnm
	I039	N0 18.904 W78 21.202	3439 msnm
	I040	N0 18.975 W78 21.451	3494 msnm
	I041	N0 18.984 W78 21.448	3496 msnm
	I042	N0 18.986 W78 21.455	3492 msnm
	I043	N0 18.979 W78 21.465	3488 msnm
PICHINCHA			
Localidad	No. muestra	Coordenadas	Altitud
Parque Nacional Cotopaxi - Entrada Norte	P001	S0 33.821 W78 26.583	3693 msnm
	P002	S0 33.825 W78 26.568	3695 msnm
	P003	S0 33.828 W78 26.567	3696 msnm
	P004	S0 33.832 W78 26.559	3698 msnm
	P005	S0 33.840 W78 26.554	3698 msnm
	P006	S0 33.846 W78 26.555	3700 msnm
	P007	S0 33.846 W78 26.555	3700 msnm
	P008	S0 33.850 W78 26.560	3697 msnm
	P009	S0 33.855 W78 26.559	3696 msnm
	P010	S0 33.870 W78 26.556	3697 msnm
	P011	S0 33.872 W78 26.553	3696 msnm
	P012	S0 33.896 W78 26.510	3701 msnm
Parque Nacional Ilinizas	P013	S0 36.295 W78 41.004	3664 msnm
	P014	S0 36.560 W78 41.123	3707 msnm
	P015	S0 36.565 W78 41.118	3706 msnm
	P016	S0 36.574 W78 41.125	3705 msnm
	P017	S0 36.577 W78 41.126	3704 msnm
	P018	S0 36.572 W78 41.141	3704 msnm
	P019	S0 36.581 W78 41.138	3708 msnm
	P020	S0 36.598 W78 41.138	3711 msnm
	P021	S0 36.605 W78 41.152	3715 msnm
	P022	S0 36.611 W78 41.153	3718 msnm
	P023	S0 36.622 W78 41.149	3723 msnm
	P024	S0 36.635 W78 41.148	3728 msnm
	P025	S0 36.315 W78 41.020	3667 msnm
Alrededores Laguna de Mojanda	P026	N0 05.447 W78 14.683	3596 msnm
	P027	N0 05.449 W78 14.688	3598 msnm
	P028	N0 05.461 W78 14.703	3603 msnm
	P029	N0 05.466 W78 14.710	3605 msnm
	P030	N0 05.477 W78 14.740	3616 msnm
	P031	N0 05.482 W78 14.745	3616 msnm
	P032	N0 05.491 W78 14.752	3615 msnm

	P033	N0 05.496 W78 14.755	3622 msnm
	P034	N0 05.500 W78 14.761	3623 msnm
	P035	N0 05.504 W78 14.766	3629 msnm
	P036	N0 05.547 W78 14.795	3637 msnm
	P037	N0 05.571 W78 14.787	3634 msnm
	P038	N0 05.584 W78 14.797	3635 msnm
	P039	N0 05.597 W78 14.806	3637 msnm
	P040	N0 05.579 W78 14.803	3642 msnm
	P041	N0 05.574 W78 14.801	3642 msnm
	P042	N0 05.568 W78 14.802	3641 msnm
	P043	N0 05.529 W78 14.756	3626 msnm
COTOPAXI			
Localidad	No. muestra	Coordenadas	Altitud
Parque Nacional Cotopaxi - Entrada Sur	C001	S0 38.989 W78 30.600	3576 msnm
	C002	S0 38.995 W78 30.595	3582 msnm
	C003	S0 38.999 W78 30.589	3579 msnm
	C004	S0 38.995 W78 30.586	3583 msnm
	C005	S0 38.994 W78 30.574	3588 msnm
	C006	S0 38.984 W78 30.544	3577 msnm
	C007	S0 38.979 W78 30.538	3594 msnm
	C008	S0 38.978 W78 30.543	3592 msnm
	C009	S0 38.958 W78 30.531	3582 msnm
	C010	S0 38.951 W78 30.579	3583 msnm
	C011	S0 38.965 W78 30.620	3576 msnm
	C012	S0 38.964 W78 30.631	3572 msnm
	C013	S0 38.945 W78 30.622	3569 msnm
	C014	S0 38.978 W78 30.690	3567 msnm
	C015	S0 38.975 W78 30.697	3568 msnm
	C016	S0 38.976 W78 30.703	3567 msnm
	C017	S0 38.970 W78 30.716	3563 msnm
	C018	S0 38.969 W78 30.720	3561 msnm
Chugchilán, vía Sigchos	C019	S0 47.429 W78 56.027	3534 msnm
	C020	S0 47.439 W78 56.022	3538 msnm
	C021	S0 47.441 W78 56.025	3539 msnm
	C022	S0 47.446 W78 56.028	3543 msnm
	C023	S0 47.446 W78 56.035	3546 msnm
	C024	S0 47.444 W78 56.038	3549 msnm
	C025	S0 47.444 W78 56.046	3555 msnm
	C026	S0 47.440 W78 56.048	3559 msnm
	C027	S0 47.435 W78 56.052	3562 msnm
	C028	S0 47.432 W78 56.057	3568 msnm
	C029	S0 47.428 W78 56.059	3570 msnm

	C030	S0 47.427 W78 56.061	3574 msnm
	C031	S0 47.426 W78 56.054	3572 msnm
	C032	S0 47.424 W78 56.043	3568 msnm
	C033	S0 47.415 W78 56.040	3565 msnm
Quilotoa, vía La Maná	C034	S0 59.949 W78 55.612	4092 msnm
	C035	S0 59.946 W78 55.618	4096 msnm
	C037	S0 59.973 W78 55.605	4093 msnm
	C038	S0 59.975 W78 55.610	4096 msnm
	C039	S0 59.979 W78 55.621	4109 msnm
	C041	S0 59.972 W78 55.633	4106 msnm
	C042	S0 59.982 W78 55.652	4104 msnm
	C043	S0 59.986 W78 55.658	4106 msnm
	C044	S0 59.941 W78 55.618	4089 msnm
	C045	S0 59.943 W78 55.613	4087 msnm