

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Determinación de la diversidad genética y estructura poblacional del guayabillo (*Psidium galapageium*) en la Isla Isabela, Galápagos, Ecuador.

Proyecto de investigación

Dayana Carolina Cazco Ordoñez

María de Lourdes Torres, Ph.D

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

Quito, 12 diciembre de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias biológicas y ambientales

**HOJA DE APROBACIÓN DE
TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Determinación de la Diversidad Genética y estructura poblacional del
guayabillo (*Psidium galapageium*) en la isla Isabela, Galápagos,
Ecuador.**

Dayana Carolina Cazco Ordoñez

Calificación:

María de Lourdes Torres, Ph.D.

Firma

Quito, 12 de diciembre de 2018

© Derechos de Autor

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

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

Firma del estudiante: _____

Nombre: Dayana Carolina Cazco Ordoñez

Código de estudiante: 00122650

C. I.: 1722379045

Lugar, Fecha Quito, 12 de diciembre de 2018

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a los dos grandes amores de mi vida.

A mi papi, que está en el cielo, y sé que me cuida siempre.

A mi esposo, que siempre ha estado conmigo apoyándome en los buenos y malos momentos y nunca ha permitido que me dé por vencida.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por estar conmigo siempre y cuando más lo he necesitado, y por permitirme culminar esta hermosa carrera.

A mis tíos, Geovanny P. y Patricia C. que se han convertido en mis padres y me brindaron su apoyo, su amor y ejemplo de perseverancia.

A mis cuatro abuelitos, Carmita, Vicente, Magolita y Carlos, que estuvieron conmigo apoyándome durante toda mi carrera.

A mis prim@s hermanas, Kuka, Emy, Dome y Nicolás que con cada locura alegran mis días.

A María de Lourdes Torres, directora de este proyecto, por toda su paciencia, apoyo y guía durante este proyecto.

A GAIAS-Grant por el financiamiento de este proyecto.

A María José, Gabriela Pozo, Juan José Guadalupe y Bernardo Gutiérrez por su ayuda guía y apoyo en la realización de este proyecto.

A todos los chicos del Laboratorio de Biotecnología Vegetal, principalmente a Darío Cueva, Analía Espín, Diego Urquía por su apoyo y amistad.

A mis amigas y amigos de la carrera por todas las aventuras y amistad durante todos estos años de la carrera.

RESUMEN

El archipiélago de Galápagos es considerado un lugar con una alta biodiversidad de especies tanto de animales como de plantas; sin embargo, ha sido afectado por el incremento de especies introducidas a las islas. El guayabillo, *Psidium galapageium* es una especie endémica del archipiélago que está siendo amenazada por su congénere la guayaba *Psidium guajava*, especie introducida de fácil dispersión. El análisis de diversidad genética de ambas especies es muy importante porque los resultados pueden contribuir a la conservación de las especies endémicas y / o al manejo de las especies invasoras. En el presente estudio se analizaron 85 individuos de *P.galapageium* provenientes de 7 localidades de la isla mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR), que se caracterizan por ser altamente polimórficos, reproducibles y fáciles de analizar. Se utilizó 15 pares de primers homólogos específicos para *P. galapageium*, los cuales se amplificaron mediante la técnica de PCR. En el genotipado de los individuos de *P. galapageium* se observaron más de dos alelos por locus, por lo que se consideró una posibilidad de tetraploidía. Por esta razón los análisis se realizaron tomando en cuenta la diploidía y la tetraploidía. En base a los resultados obtenidos en ambos tipos de ploidía (2n y 4n) en este estudio; los individuos de *P. galapageium* presentaron una diversidad genética moderadamente alta $H_e = 0.732$ y $H_e = 0.657$ respectivamente, de igual manera se encontró un total de 164 y 189 alelos. De acuerdo con los análisis de varianza molecular (AMOVA) la mayor variación genética se encuentra dentro de las poblaciones en ambos análisis. En los resultados del PCoA por localidades, se observó que los individuos no forman agrupaciones definidas, sin embargo, se presenta un leve diferenciación genética entre los individuos ubicados en la zona scalesia con respecto a los individuos de la zona de transición. Así mismo, el valor F_{st} global en ambas ploidías fueron cercanos a cero, por lo que se sugiere que existe alto flujo génico y baja diferenciación genética entre los individuos de *P. galapageium*. Adicionalmente, los resultados obtenidos en el análisis de estructura poblacional se sugiere que existe una estructura poblacional poco definida. Finalmente, mediante una prueba de verosimilitud (LTR), se determinó que los datos analizados de la diversidad genética de *P. galapageium* se ajustan mejor a una diploidía que a una tetraploidía con un 95% de confiabilidad. El presente estudio pretende contribuir con el entendimiento sobre la coexistencia entre especies endémica e introducidas para aportar con planes de control y manejo de especies invasivas.

Palabras clave: *Psidium galapageium*, especie endémica, diversidad genética, Islas, Galápagos, marcadores microsatélites.

ABSTRACT

The Galapagos archipelago has a high biodiversity of species of animals and plants; however, the islands have been affected by the increasing amount of introduced species. Guayabillo (*Psidium galapageium*) is species endemic to the islands that is possibly being threatened by its congener, guava (*Psidium guajava*), an introduced species. A genetic diversity analysis of both species is very important because the results can contribute to the conservation of the endemic species and/or the management of the invasive species. In the present study, leaves from 85 individuals of *P.galapageium* were collected from 7 sampling sites on Isabela island. DNA was extracted from the collected leaves and it was analyzed with microsatellite molecular markers (SSRs). SSRs are highly polymorphic, reproducible and easy to analyze molecular markers. Fifteen pairs of primers specific for *P. galapageium* were selected for the analysis, and amplified in each individual using PCR, after which the amplicons were genotyped using capillary electrophoresis. At least two alleles per locus were found for every marker, and in some cases more than two alleles within the same individual, which is why the possibility of tetraploidy was considered. Therefore, two types of analyses were performed, one assuming diploidy and the other assuming tetraploidy. The results for both types of analyses indicate that the individuals of *P. galapageium* have a moderately high genetic diversity, $H_e = 0.732$ (assuming diploidy) and $H_e = 0.657$ (assuming tetraploidy). 164 (assuming diploidy) and 189 alleles (assuming tetraploidy) were found. The global F_{st} values for both ploidies was close to zero, suggesting high gene flow and low genetic differentiation among *P. galapageium* individuals on Isabela island. According to the molecular variance analysis (AMOVA), the greatest genetic variation is located within populations in both analyses. The PCoA obtained shows that the individuals don't form defined groups, however there is a slight genetic differentiation among the individuals located in the scalesia zone from the individuals of the transition zone. Additionally, the results obtained in the population structure analysis suggest that there is a poorly defined population structure. Finally, a likelihood ratio test (LRT) was performed in order to determine whether the data obtained from the SSRs is better adjusted to a diploid or tetraploid model, the results of which indicate with 95% reliability that the diploid model is the accurate one. The present study intends to contribute to understanding the coexistence between endemic species and introduced species in the Galapagos islands, eventually leading to management and control of invasive species plants.

Key words: *Psidium galapageium*, endemic species, genetic diversity, Islands, Galápagos, microsatellite markers.

TABLA DE CONTENIDO

DERECHOS DE AUTOR	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. Introducción.....	15
1.1. Islas Galápagos	15
1.2. Especies endémicas vs. especies invasoras en el Archipiélago.....	16
1.3. Isla Isabela	17
1.4. Microambientes en zonas insulares	17
1.5. Especie en estudio, <i>Psidium galapageium</i>	20
1.6. Amenaza de las especies invasoras en los ecosistemas insulares.....	21
1.7. Importancia de la diversidad genética en regiones insulares.....	24
1.8. Marcadores Microsatélites.....	25
2. Objetivos.....	27
2.1. Objetivo General	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. Justificación.....	28
4. Área de Estudio	30
5. Materiales	31
5.1. Material Vegetal	31
5.2. Extracción de ADN	31
5.3. Cuantificación de ADN	31
5.4. Amplificación de regiones microsatélites por PCR.....	31
5.5. Electroforesis en geles de agarosa.....	32
5.6. Secuenciamiento de los individuos de <i>P. galapageium</i>	32
5.7. Genotipado	32
6. Métodos	33
6.1. Extracción de ADN	33
6.2. Preparación de muestras	34
6.3. Diseño y amplificación de regiones microsatélites por PCR con primers específicos para <i>P. galapageium</i>	34
6.4. Genotipado de los individuos de <i>P. galapageium</i>	36
6.5. Análisis de datos.....	36
7. Resultados.....	40

7.1.	Extracción y cuantificación de ADN.....	40
7.2.	Amplificación de regiones microsatélites	40
7.3.	Genotipado de los individuos de <i>Psidium galapageium</i>	40
7.4.	Análisis de Datos (2n)	41
7.4.1.	Diversidad alélica y genética.....	41
7.4.2.	Distribución de la diversidad.....	42
7.4.3.	Análisis de la estructura poblacional.....	43
7.4.4.	Análisis de endogamia y parentesco	44
7.4.5.	Análisis comparativo de diversidad genética entre individuos de <i>P.galapageium</i> en la Isla Santa Cruz e Isabela.....	45
7.5.	Análisis de Datos (4n)	45
7.5.1.	Diversidad genética y alélica de <i>P. galapageium</i>	45
7.5.2.	Distribución de la diversidad.....	46
7.5.3.	Análisis de estructura poblacional.....	47
7.5.4.	Análisis de endogamia.....	48
7.6.	Comparación de ploidías	48
8.	Discusión	49
8.1.	Análisis de Datos ploidía 2n.....	49
8.1.1.	Diversidad alélica de <i>P. galapageium</i>	49
8.1.2.	Diversidad genética de <i>P.galapageium</i>	50
8.1.3.	Flujo génico de <i>Psidium galapageium</i> en la isla Isabela.....	52
8.1.4.	Distribución de la diversidad genética de <i>P. galapageium</i>	54
8.1.5.	Análisis de la estructura poblacional.....	56
8.1.1.	Análisis endogamia y parentesco	59
8.2.	Comparación de la diversidad genética de <i>P. galapageium</i> en la isla Isabela y Santa Cruz	62
8.2.1.	Diversidad alélica y genética de <i>P. galapageium</i> en las dos islas.....	62
8.2.2.	Diferenciación genética de <i>P. galapageium</i> en las dos islas	63
8.2.3.	Distribución de la diversidad y estructura poblacional de <i>P. galapageium</i> en las dos islas	63
8.2.4.	Análisis de endogamia de <i>P. galapageium</i> en las dos islas.....	64
8.3.	Comparación de la diversidad genética de <i>P. galapageium</i> considerando las dos ploidías (2n y 4n)	65
8.3.1.	¿Qué tipo de ploidía se ajusta mejor a los datos obtenidos de diversidad genética en <i>P. galapageium</i> ?.....	68
8.4.	Importancia de la diversidad genética en la conservación de especies endémicas	70
9.	Conclusiones.....	72
10.	Recomendaciones.....	73

11. Bibliografía.....	75
12. Tablas	85
13. Figuras	90
14. Anexos.....	97

Índice de tablas

Tabla 1.- Marcadores microsatélites SSR utilizados en el estudio, secuencias <i>Forward</i> y <i>Reverse</i> , el fluoróforo utilizado para cada uno de los primers, la temperatura con la que se amplificó exitosamente. También, se indica el número de alelos obtenidos en cada locus analizado y el rango de los tamaños de los alelos encontrados en pares de bases (pb).	85
Tabla 2.- Individuos que presentaron más de dos alelos por locus con los siguientes marcadores microsatélites SSR.	86
Tabla 3.- Indicadores de diversidad genética para las 7 localidades de <i>P.galapageium</i> en la Isla Isabela. Para cada localidad se indica el número de individuos analizados, el número de alelos, el número de alelos privados, la heterocigosidad observada y esperada	87
Tabla 4.- Valores <i>Pairwise</i> F_{ST} para todas las localidades en estudio de <i>P.galapageium</i> de la Isla Isabela	87
Tabla 5.- Coeficientes de Coancestry obtenidos mediante el método de Wang para los individuos analizados de <i>P.galapageium</i> de la Isla Isabela.....	87
Tabla 6.- Indicadores de diversidad genética para las poblaciones analizadas de <i>P.galapageium</i> de las Islas Isabela y Santa Cruz. Para cada isla se indica el número de individuos muestreados, el número de alelos obtenidos en total, el número de alelos privados, y la heterocigosidad esperada y observada	88
Tabla 7.- Número de alelos compartidos y no compartidos en las poblaciones de <i>P.galapageium</i> analizados en la Isla Isabela y Santa Cruz (Soria, 2018).....	88
Tabla 8.- Valores <i>Pairwise</i> F_{ST} para todas las localidades en estudio de <i>P.galapageium</i> de la Isla Isabela comparados con la isla Santa Cruz.	88
Tabla 9.- Indicadores de diversidad genética para las 7 localidades de <i>P.galapageium</i> en la Isla Isabela. Para cada localidad se indica el numero de individuos analizados, el número de alelos, el número de alelos privados, la heterocigosidad esperada.....	89
Tabla 10.-Valores <i>Pairwise</i> F_{ST} para todas las localidades en estudio de <i>P.galapageium</i> de la Isla Isabela.	89

Índice de figuras

- Figura 1.- Árbol de *Psidium galapageium* en la isla Isabela, de la localidad de Cerro Grande (tomada por María José Pozo y Juan Delgado). 90
- Figura 2.- Mapa del área de estudio donde se indica la localización de los individuos de *P.galapageium* muestreados. 90
- Figura 3.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del ADN de los productos amplificados de los marcadores microsatélites GYB27 y GYB8 de 10 individuos de *P.galapageium* analizados en la isla Isabela (RG: Ricardo García, SJ: San Joaquín, BA: El Basurero, L: ladder de 100 pb (Invitrogen), C-: control negativo. 91
- Figura 4.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela Cada color de punto representa cada una de las 7 localidades. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos (sin considerar necesariamente su procedencia) representados con circunferencias de colores verde, azul y rojo. 91
- Figura 5.- Dendograma Neighbor Joining (NJ) por las localidades analizadas de los individuos de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Las longitudes de las ramas representan las distancias genéticas entre las localidades. 92
- Figura 6.- Resultado de estructura poblacional considerando los 86 individuos muestreados en Isabela en las 7 localidades con un valor óptimo de $K=3$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde, azul y rojo). 92
- Figura 7.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 86 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.05-0.30), lo cual indica que no hay endogamia en la población. 93
- Figura 8.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela Cada color de punto representa cada una de las 7 localidades. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos (sin considerar necesariamente su procedencia) representados con circunferencias de colores verde, azul y rojo. 93
- Figura 9.- Dendograma Neighbor Joining (NJ) por las localidades analizadas de los individuos de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Las longitudes de las ramas representan las distancias genéticas de las localidades. 94
- Figura 10.- Resultado de estructura poblacional considerando los 86 individuos muestreados en Isabela en las 7 localidades con un valor óptimo de $K=2$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde y rojo). 94
- Figura 11.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 86 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.1-0.50), lo cual indica que no hay endogamia en la población. 95

Figura 12.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela y en la isla Santa Cruz (Soria, 2018). Los dos colores representan los individuos de cada isla. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en dos grupos dependiendo de su lugar de procedencia representados con circunferencias de color azul y rojo. Se debe analizar los individuos de color celeste (Santa Cruz) que forman parte del grupo que engloba a los individuos de Isabela. 95

Figura 13.- Resultado de estructura poblacional considerando los 173 individuos muestreados en Isabela (86 individuos) y en Santa Cruz (87 individuos) con un valor óptimo de $K=3$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde, azul y rojo). 96

Figura 14.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 173 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela y Santa Cruz, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.1-0.40), lo cual indica que no hay endogamia en la población. 96

Anexos

Anexo 1.- Microambientes característicos en las islas Galápagos.	97
Anexo 2.- Fórmula de Likelihood Ratio Test para el cálculo de XLR2.....	97
Anexo 3.- 86 muestras recolectadas de 7 localidades en la Isla Isabela, cuantificación en ng/ul, coordenadas de recolección y altura de los individuos sobre el nivel del mar.....	99
Anexo 4.- Picos de fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker. a) Individuo YSJ3 amplificado con el primer GYB18 y fluoróforo PET, se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 392 Y 395 pb. b) Individuo YRG1 amplificado con el primer GYB23 y fluoróforo FAM, se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 336 y 345 pb. c) Individuo YCG13 amplificado con el primer GYB4 y fluoróforo NED se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 324 y 333 pb	100
Anexo 5.- Picos e fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker de los amplicones del locus GBY25 para 3 individuos (a. YCG1, b.YCG6, c. YCG4) de <i>P.galapageium</i> muestreados en la Isla Isabela. Se reportaron 4 alelos en este locus para la población estudiado, es decir una ploidía 4n confirmada. Individuos amplificados con el primer GYB25 y fluoróforo FAM se muestran cuatro alelos con tamaños de 329, 334, 341, 347 pb.	101
Anexo 6.- Picos de fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker de los amplicones del locus GBY9 para 2 individuos (a. YSJ14, b.YSJ16) de <i>P.galapageium</i> muestreados en la Isla Isabela. Se reportaron 3 alelos en este locus para la población estudiado, es decir una tetraploidía confirmada. Individuos amplificados con el primer GYB9 y fluoróforo VIC se muestran tres alelos con tamaños de 290, 293, 302, 314 pb	101
Anexo 7.- Fórmula para el cálculo de Nm (número de migrantes) Valores menores a 1 predomina la deriva génica, valores mayores a 1 predomina el flujo génico (Uribe, 2014).	102

1. Introducción

1.1. Islas Galápagos

Las Islas Galápagos es un archipiélago oceánico formado por trece islas volcánicas ubicadas a 1000 km al oeste de Ecuador sobre la línea ecuatorial, y tiene una población alrededor de 20.000 a 30.000 personas distribuidas principalmente en las islas San Cristóbal, Santa Cruz e Isabela (Gordillo, 1990). El área de tierra total entre islas y las rocas sobre el nivel del mar es de aproximadamente 7856 km². La isla Isabela es la más grande de las Islas Galápagos, las siguientes cinco islas más grandes, en orden de tamaño, son las islas Fernandina, San Salvador, San Cristóbal, Santa María y Marchena (Wiggins *et al.*, 1971).

El archipiélago se originó debido a una serie de explosiones volcánicas que se elevaron hacia la superficie del mar. El Archipiélago nunca había tenido contacto con otras especies de seres vivos del continente durante alrededor de 1 a 3,3 millones de años, por lo que el Archipiélago se encontraban deshabitado en ese momento, y no se había encontrado evidencia de humanos anteriormente (Schofield, 1989). Después de este tiempo se ha reportado en la literatura, visitas de personas indígenas desde el continente de América del Sur, así como también de marineros balleneros y selladores (Gordillo, 1990). Las Islas Galápagos fueron oficialmente descubiertas por Tomás de Berlanga en el año de 1535 por lo que todo ser vivo que haya llegado después de esa fecha se ha considerado como introducido (Groves, 2001).

Todas las islas de tamaño apreciable, y muchas de las rocas más pequeñas, fueron originalmente nombradas por los capitanes y bucaneros ingleses dado que la mayoría de las primeras visitas a las islas fueron hechas por gente de Inglaterra, Francia y América del Norte, lo que ahora es Estados Unidos. Los nombres españoles no se aplicaron, y estos

fueron ignorados por las tripulaciones de los balleneros (Groves, 2001). Cuando la gente de Ecuador comenzó a colonizar las islas más grandes, se aplicaron nombres ecuatorianos y se adoptaron oficialmente como se conoce ahora a todas las Islas (Wiggins *et al.*, 1971).

1.2. Especies endémicas vs. especies invasoras en el Archipiélago

Una de las mayores amenazas para el ecosistema terrestre de las Islas Galápagos es el número y la distribución cada vez mayor de especies de plantas y animales invasoras en todo el archipiélago, pero es particularmente evidente en las cuatro islas más pobladas: Santa Cruz, San Cristóbal, Floreana e Isabela. El aumento de la presencia humana a través de la inmigración y el turismo ha acelerado la introducción de especies no endémicas (Walsh *et al.*, 2008). Se ha reportado en la literatura que existen alrededor de 1581 diferentes especies de plantas presentes en las Islas Galápagos, de las cuales 560 especies son clasificadas como nativas y el 32% de ellas son endémicas. Se ha introducido al Archipiélago aproximadamente 825 especies de plantas, muchas de las cuales fueron llevadas a las islas por los primeros asentamientos humanos durante la época de 1800 y 1900 (Jaramillo *et al.*, 2017). De las especies de plantas introducidas, aproximadamente 30 están generando un efecto negativo sobre la vegetación nativa (Buddenhagen *et al.*, 2004). Las Islas Galápagos son un ejemplo común de Archipiélago en el que la flora nativa es pobre, es decir, el área total de cada isla cuenta con un menor número de especies que un área del mismo tamaño en el continente. Como consecuencia, la competencia interespecífica es bastante más débil y la vegetación es altamente susceptible a la invasión de especies invasoras más competitivas (Groves, 2001). A pesar de que el 95% del Archipiélago está protegido como Parque Nacional, la persistencia de las comunidades y especies de plantas endémicas está en mayor riesgo debido a las presiones directas e indirectas de la presencia y las actividades de los humanos en las islas. Según los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la naturaleza (UICN) dice que una de

las amenazas más importantes proviene de las especies de plantas y animales introducidas (Guézou *et al.*, 2007).

1.3. Isla Isabela

La isla Isabela es una de las islas más grandes del Archipiélago, y fue llamada así en honor a la Reina Isabel I que fue quien patrocinó el viaje de Cristóbal Colón, donde las primeras colonizaciones se dieron en 1893. La forma que tiene la isla Isabela se debe a la fusión de seis grandes volcanes de los cuales cinco se encuentran en estado activo. El punto más alto de la isla es el del volcán Wolf, que llega a los 1707 msnm (Guézou *et al.*, 2007).

Isabela tiene un área de extensión de 4669.32 km², ocupa el 60% de la superficie del total de las Islas Galápagos, y es cinco veces más grande que la isla Santa Cruz (Wiggins *et al.*, 1971). La isla Isabela contiene 86 especies de plantas endémicas y se han introducido solamente a Isabela alrededor de 153 especies de plantas (Guézou *et al.*, 2007). Dentro de las especies de plantas introducidas se encuentra la guayaba (*Psidium guajava*) que llegó al Archipiélago en 1869, la mora (*Rubus niveus*) y el quino (*Cinchona pubescens*) que han alterado la composición y la estructura de los ecosistemas naturales de la isla (Guézou *et al.*, 2010).

1.4. Microambientes en zonas insulares

Algo característico de las regiones insulares es la formación de microambientes en una misma zona. Estos microambientes se deben a factores como la humedad, precipitación, radiación solar, y tipo de suelo que varían por la diferencia de altitud en un mismo lugar de una misma isla. Los microambientes son capaces de albergar una alta riqueza y abundancia tanto de flora como de fauna. Las Islas Galápagos se encuentran ubicadas en la "zona seca" del Pacífico ecuatorial y reciben mucha menos lluvia que las

áreas al norte y sur. Aunque se encuentra en el Ecuador, el Archipiélago no tiene un clima tropical, debido a la influencia de las corrientes oceánicas y los vientos que interactúan, regidos por los movimientos de la Zona de Convergencia Intertropical y los eventos de El Niño (Stoops, 2013).

Hay dos estaciones principales en las Islas Galápagos con grandes diferencias en las tasas de temperatura y precipitación. De enero a junio (la estación cálida, "invierno"), el clima es cálido con lluvias fuertes ocasionales. De junio a diciembre (la estación fría, "garua"), el aire es más fresco y presenta una niebla cargada de humedad a las tierras altas, mientras que las áreas de tierras bajas permanecen secas; como consecuencia de esto, los suelos en las diferentes islas del Archipiélago son diferentes en su espesor, estructura y composición (Adelinet *et al.*, 2007).

La precipitación es importante, ya que cuando las masas de aire húmedo se acumulan alrededor de las islas, las nubes generalmente ocupan una capa entre un límite inferior de 200 a 300 m un límite superior de 400 a 500 m. En estas zonas (400 m) es donde ocurre la mayor parte de la precipitación, estas diferencias en las precipitaciones se muestran geográficamente por el período vegetativo en las islas. Así mismo otros factores que generan estos microambientes son cambios en las corrientes oceánicas, la inclinación y las pendientes que pueden variar en la misma isla y de isla a isla, la elevación de un área o zona en particular, así como también el tipo de suelo que varía en función de la altura (Hamann, 1979 ; Adelinet *et al.*, 2007). La distribución de la vegetación muestra una dependencia directa de la altitud, la pendiente, la exposición a los vientos alisios y el nivel de humedad del aire (Ingala *et al.*, 1989).

Laruelle en 1966 estudio los suelos de Santa Cruz y reconoció cinco zonas de suelo, ha sido la única isla en el archipiélago cuyos suelos han sido investigados. Sin embargo, el estudio de suelos en una isla puede ser suficiente; debido a la homogeneidad de los

materiales volcánicos de isla a isla y la uniformidad de los regímenes climáticos en toda el área, es probable que haya muy poca desviación del patrón de suelo de Santa Cruz en las islas más grandes, como es en el caso de la isla Isabela (Anexo 1) (Wiggins *et al.*, 1971; Adelinet *et al.*, 2007). Bowman (1966) ha determinado 6 zonas de vegetación detalladas a continuación.

La zona I se denomina zona árida, la cual va desde el nivel del mar hasta una altitud de 30 m, su suelo se caracteriza por ser delgado, y compuesto por materiales intersticiales que tienen un alto porcentaje de bases saturadas. Por lo general, es de color rojizo, y tiene mucha arcilla. La zona árida no está presente en algunos lugares de la isla Isabela ya que el mar ha invadido valles poco profundos o grietas de la isla (Stoops, 2013). La zona de transición, comienza a una altura de los 30 a 220 m, esta zona se caracteriza por las grandes extensiones de rocas de lava sobre las cuales no se ha formado el suelo o que la pequeña cantidad de suelo presente ha sido eliminada por la erosión. Esta zona cubre una gran área de las Islas Galápagos y ha sido explorada por la mayoría de botánicos. La vegetación de la zona de transición se encuentra a pocos metros sobre el nivel del mar en algunas partes del suroeste de Isabela, donde las corrientes de aire cargadas de humedad golpean por primera vez grandes superficies y arrojan mucha más agua de la que pueden atravesar las nubes que pasan a pocos kilómetros de distancia. La zona III se denomina zona Scalesia, situada sobre los 220 a 330 msnm, el suelo contiene una mezcla de ceniza y arcilla, es de color marrón rojizo. El límite entre las zonas III y IV no es muy marcada, sin embargo, el suelo de la zona IV es de color marrón en lugar de rojizo, esta zona tiene menos influencia de las rocas basálticas y más de contenido piroclástico, y este tipo de zona se encuentra de los 330 a 550 metros. La zona V es la zona Miconia alcanzando hasta los 630 metros donde se puede encontrar arbustos, compuestos de *Miconia robinsoniana* de 2 a 3,5 m de altura o de helechos. La zona VI o zona de tierras altas, que

comprende los picos más altos, presenta una vegetación pampeana sin árboles de arbustos y helechos de crecimiento bajo (Wiggins *et al.*, 1971; Stoops, 2013).

1.5. Especie en estudio, *Psidium galapageium*

El guayabillo, (*Psidium galapageium*) o también conocido como “Galápagos Guava” (Figura 1) es una planta endémica de las Islas Galápagos que se encuentra ampliamente distribuida por el Archipiélago, especialmente en áreas tropicales. Se ha reportado su presencia en las islas Fernandina, Isabela, Pinta, Santa Cruz, Santiago y San Cristóbal, principalmente en tierras bajas áridas (McMullen, 1999). Es un arbusto perennifolio hermafrodita de tres a ocho metros de altura, sus hojas son simples ovaladas y de color verde oscuro con puntos transparentes. Sus flores son blancas pequeñas y se encuentran en las ramas, sus frutos son bayas de hasta 8cm de diámetro, el fruto es carnoso, de color amarillo y contiene muchas semillas (Porter, 1968).

El guayabillo se adapta fácilmente a cualquier tipo de suelo, sin embargo se desarrolla mejor en suelos donde hay un buen sistema de agua y una gran cantidad de materia orgánica. Existen dos variedades de *Psidium galapageium*, la primera variedad descrita es *Psidium galapageium* var. *galapageium* y *Psidium galapageium* var. *howellii*, a estas dos variedades se las puede distinguir por la forma de sus brotes. *Psidium galapageium* var. *galapageium* no tiene brotes lobulados, y sus flores tienen el cáliz abierto, mientras que *Psidium galapageium* var. *howellii* tiene brotes con cinco lóbulos y su cáliz está dividido en 4 lóbulos irregulares (Porter, 1968).

Psidium galapageium al ser una especie que solamente se encuentra en las Islas Galápagos no existen muchos estudios sobre esta especie. Sin embargo, la mayor parte de estos estudios son sobre morfología, mas no de diversidad genética. En un estudio realizado por Cimadon *et al.*, (2016) ha reportado que las hojas de *Psidium galapageium* presentan compuestos activos con propiedades repelentes que son utilizados por aves,

principalmente por los pinzones. Especies como *Camarhynchus parvulus* y *Geospiza fuliginosa* utilizan las hojas de *P. galapageium* como loción para protegerse de la mosca introducida en las Islas Galápagos, *Philornis downsi*. Dentro de los compuestos activos presentes en las hojas de *P. galapageium* los cuales se han relacionado por tener un efecto repelente contra insectos son el limoneno, α y β - pipeno, estos compuestos también se encuentran presentes en la especie *P. guajava* (Cimadon *et al.*, 2016).

1.6. Amenaza de las especies invasoras en los ecosistemas insulares

Los ecosistemas insulares son mucho más vulnerables a invasiones biológicas que cualquier otro tipo de ecosistema. Las plantas introducidas por el hombre se han vuelto problemáticas en los últimos 150 años, y la mayoría de los problemas de malezas tienen menos de 50 años. El aumento en las introducciones de plantas es paralelo al aumento de la población humana, con una tasa de introducción reciente de 10 especies de plantas por año (Tye, 2007). Las poblaciones de plantas en ecosistemas insulares son más propensas a la extinción que las que se encuentran en el continente. Las especies endémicas de las islas son aún más vulnerables, su tasa de extinción es más alta que las especies que son invasoras o que no son endémicas (Frankman, 1998).

En las Islas Galápagos el número de especies introducidas ha ido creciendo durante los años (Tye *et al.*, 2007) llamando la atención de los investigadores. Cuando una especie exótica invade un sistema natural, inmediatamente se pueden ver los efectos sobre las especies endémicas. Las plantas introducidas compiten con las endémicas y generan cambios en el ambiente como en el suelo o agua alterando el ecosistema (Schofield, 1989). Las plantas introducidas se encuentran distribuidas alrededor del Archipiélago, pero principalmente en las cuatro islas habitadas: Isabela, Floreana, San Cristóbal y Santa Cruz, particularmente en las zonas agrícolas (Groves, 2001).

Las plantas invasoras tienen efectos fuertes y ocasionan cambios en la biota nativa del lugar, cambios en la comunidad, en el ecosistema y también a en el paisaje. Indudablemente están contribuyendo a la disminución de la riqueza de especies endémicas en el Archipiélago (Sax *et al*, 2002). El riesgo de la introducción, el establecimiento y la propagación de especies invasoras en los sistemas insulares depende de una serie de factores ecológicos y socioeconómicos (como el clima, la disponibilidad de recursos y la demanda de ciertos bienes y servicios) (Reaser, 2007). Las especies invasoras se han convertido en la principal causa de extinción y disminución en la población de especies tanto de animales como de plantas en los ecosistemas insulares. Las islas son los ambientes más propensos a la invasión debido a la falta de competidores y depredadores que pueden controlar las poblaciones en los ecosistemas nativos. Además, las islas suelen contener nichos ecológicos que no han sido llenados, esto hace que la probabilidad de invasiones sea aún más exitosa (MacArthur y Wilson, 1967). El impacto de las especies introducidas en la biodiversidad de las islas debe evaluarse en múltiples niveles de organización, incluidos los ecosistemas, hábitats, especies y genes. Las interacciones múltiples como los flujos de energía, el ciclo de nutrientes y la hibridación pueden ocurrir en estas categorías. Así mismo, los bienes y servicios de los ecosistemas como el agua potable, plantas medicinales y protección de cultivos son los beneficios tangibles para la sociedad derivados de estas interacciones (Walsh, 2007).

Una de las especies de plantas que ha traído problemas a los ecosistemas de las Islas Galápagos es la guayaba (*Psidium guajava*). La guayaba se ha convertido en una planta invasora debido a su amplia distribución y porque tiene todas las características de una planta invasora. Las plantas invasoras se caracterizan por su capacidad de crecer y extenderse agresivamente, estas pueden ser árboles, arbustos, hierbas o flores. Pueden reproducirse rápidamente por medio de sus raíces, y también porque su fruto tiene una

gran cantidad de semillas lo que le provee una mayor capacidad de dispersión (Johnston, 2017). Cuando una planta se vuelve invasora, lo que sucede es que al tener gran cantidad de semillas se dispersa de una manera mucho más rápida y hacia grandes extensiones debido a que son llevadas por pájaros y animales como las tortugas que comen los frutos. La guayaba es una planta leñosa que se ha convertido en competencia para el resto de plantas que cohabitan con ella, y muchas especies endémicas están siendo desplazadas por alteraciones en los suelos que *P.guajava* ocasiona (Jager *et al.*, 2007).

En la isla Isabela se ha detectado la presencia de la guayaba (*Psidium guajava*), la cual habita junto con su especie endémica, el guayabillo (*Psidium galapageium*) (Tye, 2006). La guayaba (*P. guajava*) posiblemente se encuentre formando híbridos con su congénere el guayabillo (*P. galapageium*). La hibridación es un fenómeno frecuente entre las plantas, que se considera una fuerza evolutiva importante, ya que puede conducir a la creación de nuevas especies y / o a un aumento de la diversidad genética intraespecífica. Además, la hibridación entre la especie endémica y su congénere relacionado puede amenazar a la especie endémica mediante la asimilación genética si el híbrido es reproductivamente superior en comparación con la especie endémica. En un estudio en la isla Socorro en México se encontró la presencia de individuos híbridos entre las especies endémicas *Psidium socorrense* y la especie *Psidium sartorianum* y los resultados fueron negativos para esta especie endémica ya que hubo una reducción del fitness debido a que los híbridos presentaron una mejor adaptación (López- Caamal *et al.*, 2014).

Las actividades humanas, como la agricultura, la construcción de carreteras y la introducción de grandes herbívoros, así como las perturbaciones naturales, pueden llevar a la creación de nuevos hábitats en los que los híbridos presenten un mayor fitness que los individuos parentales (Wolf *et al.*, 2014). Es ahí donde recae la importancia de estudiar la diversidad genética tanto de la especie introducida invasora sobre la especie

endémica de un mismo género para evitar el desplazamiento completo de la especie endémica, descartar la formación de híbridos entre la especie endémica y la introducida y así implementar planes de manejo para conservar su diversidad.

1.7. Importancia de la diversidad genética en regiones insulares

La diversidad biológica se define como la variedad y la abundancia de especies en una unidad de estudio definida, la cual puede basarse tanto en la riqueza que depende del número de especies en un lugar y variedad (Magurran, 2013). La diversidad genética se refiere a la variedad de alelos presentes en una especie, donde se incluye variaciones genéticas dentro de la población. Esta variabilidad puede ser explicada por mutaciones y recombinaciones que se generan a lo largo del tiempo, así como también la deriva génica, flujo génico y selección natural que contribuyen a la diversidad que existe en las especies (Eguiarte y Souza, 2010).

Tanto la diversidad biológica como genética son factores importantes dentro de los ecosistemas insulares debido a que estos tipos de ecosistemas tienen una alta proporción de flora y fauna endémica. La dispersión entre islas desempeñó un papel fundamental en la especiación y en la estabilidad de poblaciones pequeñas. Aunque los principales eventos evolutivos pudieron haber ocurrido hace millones de años. Los estudios han demostrado la importancia de la dinámica poblacional a corto plazo para determinar la supervivencia de los competidores y las presiones evolutivas resultantes de aquellos nichos superpuestos (Barrett, 1996).

En Galápagos, varias especies de plantas como el árbol de quinina (*Cinchona pubescens*), la planta del aire (*Bryophyllum pinnatum*), la lantana (*Lantana camara*), la hierba de elefante (*Pennisetum purpureum*) y la guayaba (*Psidium guajava*), han sido reconocidas por tener efectos perjudiciales en hábitats nativos de la isla debido a la transformación de la composición y estructura de las comunidades de las plantas nativas

(Reaser, 2007). Sin embargo, a diferencia de otros archipiélagos tropicales, el Archipiélago de Galápagos todavía se considera un ambiente prístino, con 95% de su biodiversidad pre-humana intacta (Guézou et al., 2010). Es ahí donde recae la importancia de mantener la biodiversidad que caracteriza a las islas. En diferentes lugares del Archipiélago se ha determinado la coexistencia de *P. guajava* y *P. galapageium*. Ambas especies compiten por espacio y nutrientes, y es por esta razón que es de suma importancia determinar la diversidad genética de ambas especies para plantear programas de control y manejo de la especie invasora, así como de conservación de la especie endémica.

1.8. Marcadores Microsatélites

Las regiones microsatélite o repeticiones simples en tándem se encuentran en todos los genomas de individuos tanto eucariotas y procariotas. Estos motivos que se repiten están presentes en regiones codificantes y no codificantes. Una característica importante de los microsatélites es que son altamente polimórficos, reproducibles, codominantes es decir permiten diferenciar individuos entre homocigotos y heterocigotos, y se encuentran distribuidos a lo largo del genoma (UOD, 2017). Las características mencionadas junto con la alta tasa de mutación y un alto número de alelos han hecho que los microsatélites sean marcadores eficaces y altamente utilizados en análisis de genética de poblaciones, mapeo de genomas, estudio taxonómico, diversidad genética, huellas genéticas y otros estudios a gran escala (Hosseinzadeh *et.al*, 2005).

En este estudio se utilizaron marcadores moleculares microsatélites SSR (simple sequence repeats) ya que han sido ampliamente usados en plantas y han tenido un buen rendimiento (Henry, 2012). Los SSR son repeticiones en tándem de 1 a 6 nucleótidos y son abundantes en el genoma de todos los organismos. Para la amplificación de los marcadores microsatélites se debe diseñar primers específicos complementarios a

las regiones flanqueantes a la región que se desea amplificar. Los marcadores SSR pueden determinar polimorfismos en todo el genoma, y por lo tanto permite amplificar de una forma específica los alelos de cada locus (Ríos *et al.*, 2009). La amplificación de los microsatélites se realiza utilizando la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para lo cual se requieren de primers específicos que se van a hibridar en las regiones conservadas que flanquean la región de la secuencia de ADN (Masuelli, 1999). El análisis con microsatélites puede tener diferentes aplicaciones, desde análisis de diversidad y mejoramiento genético, así como también en estudios de estructura poblacional y relaciones filogenéticas (Godoy, 2009)

En el presente estudio se utilizaron 15 pares de primers diseñados para la amplificación de regiones microsatélites de ADN de guayabillo (*Psidium galapageium*) con el propósito de analizar la diversidad genética de 86 individuos de guayabillo provenientes de 7 localidades de la isla Isabela y comparar los resultados obtenidos de la misma especie en la isla Santa Cruz.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Determinar la diversidad genética y estructura poblacional de la especie endémica *Psidium galapageium* en la isla Isabela en Galápagos utilizando marcadores moleculares microsatélites.

2.2. Objetivos específicos

- Estandarizar la amplificación de *P. galapageium* utilizando primers SSR específicos para esta especie.
- Analizar la diversidad genética de *P. galapageium* mediante la utilización de marcadores SSR específicos.
- Comparar la diversidad genética de *Psidium galapageium* de la isla Isabela con la isla Santa Cruz.
- Comparar los análisis estadísticos obtenidos en base a la ploidía del guayabillo (diploide vs. tetraploide) en la isla Isabela.

3. Justificación

Las islas oceánicas son laboratorios naturales para estudios de evolución de plantas. Una característica de la flora de las islas oceánicas es el alto número de especies endémicas que ocurren en áreas pequeñas. El aislamiento geográfico de las islas oceánicas ha facilitado el establecimiento y la evolución de diferentes especies en comparación con los sistemas en el continente (Reaser, 2007). Para las zonas insulares una de las mayores amenazas para la biodiversidad son las especies introducidas (Jager *et al.*, 2013).

Los hábitats de las Islas Galápagos están siendo amenazados seriamente por especies introducidas invasivas. Principalmente estas especies introducidas se encuentran ocupando localidades agrícolas y urbanas; sin embargo, tienen la habilidad de pasar fronteras e invadir otros terrenos en las diferentes áreas protegidas del archipiélago (Itow, 2003). Se han introducido a las Islas Galápagos alrededor de 825 especies de plantas. Este valor supera el número de especies nativas y endémicas presentes en el archipiélago (Tye, 2006). De todas las especies introducidas aproximadamente 30 se consideran invasivas (Hamann, 1991), entre ellas la guayaba (*Psidium guajava*), el quino (*Chinchona pubescens*) o la mora silvestre (*Rubus niveus*), son plantas con fácil dispersión, que alteran la composición del suelo y son una competencia a nivel de nutrientes con las especies endémicas, todos estos factores juntos permiten que la diversidad de plantas endémicas disminuya paulatinamente (Jager *et al.*, 2013; Reaser, 2007).

Una de las plantas endémicas de las Islas Galápagos, es el guayabillo, *Psidium galapageium*. El guayabillo al ser una especie endémica del Archipiélago es considerablemente importante para algunas especies de aves, como los pinzones que utilizan los compuestos presentes en las hojas de *P. galapageium* como repelente contra las moscas invasoras que asechan contra ellos (Cimadon *et al.*, 2016); sin embargo, esta

especie está siendo afectado por una planta introducida de su misma familia como es la guayaba.

La guayaba, *Psidium guajava* se introdujo a las Galápagos desde el Ecuador aproximadamente en el año 1850, y ahora es una especie invasora (Bensted, 2002). Se ha reportado la presencia de ambas especies en la mayoría de islas del Archipiélago, incluyendo Isabela. Esta coexistencia entre especie endémica e invasora del mismo género ha causado gran interés debido a los efectos que negativos que ello contrae. Un efecto negativo de esta coexistencia es la formación de híbridos, lo cual conllevaría a la especie endémica a dejar de tener descendencia y solamente formar híbridos con la especie introducida, la guayaba (Huxel, 1999). Esto se ha visto en otras especies endémicas e introducidas del mismo género como por ejemplo las especies *Rubus hawaiensis* y *Rubus niveus* en Hawai, así como también en especies del género *Psidium* (*Psidium socorrense* y *Psidium sartonium*) en la isla del Socorro, donde se evidencio un desplazamiento de la especie endémica debido a que los híbridos tenían una mejor adaptación al medio (Randell *et al.*, 2014; López-Caamal *et al.*, 2014). Por lo tanto en función de lo visto previamente, es importante conocer la situación actual de ambas especies en el Archipiélago.

Finalmente, los patrones de dispersión de especies invasoras son el resultado de procesos naturales que actúan en conjunto (Iovanna, 2007). Por lo tanto, para el control tanto de la especie invasora como el manejo de la especie endémica debería basarse en el entendimiento de las interacciones entre los seres humanos y los factores ambientales que influyen en la dispersión de estas especies. La información acerca de la diversidad genética de las distintas poblaciones de una especie en un área geográfica determinada contribuye a entender la dinámica ecológica de la especie y ayuda a establecer programas de manejo adecuado.

4. Área de Estudio

En el presente estudio se recolectaron hojas de 86 individuos de *P. galapageium* de 7 localidades del sur la isla Isabela (Ricardo García, San Joaquín, El Basurero, Finca Morocho, El Mango, Barrio Loja, y Cerro Grande) (Figura 2). En cada localidad se recolectaron muestras de hojas de 86 individuos de guayabillo (*Psidium galapageium*), alrededor de 10 a 20 individuos por localidad.

La extracción y cuantificación de ADN fue realizada por María José Pozo y Juan Delgado en el Laboratorio de Biología Molecular del Galápagos Science Center (GSC) en la isla Isabela. La dilución, amplificación del ADN, electroforesis en geles de agarosa y los análisis estadísticos de las muestras de guayabillo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, Campus Cumbayá.

5. Materiales

5.1. Material Vegetal

Se utilizaron hojas de 86 individuos de *Psidium galapageium* de 7 localidades de la isla Isabela.

- Ricardo García: 12 muestras recolectadas.
- San Joaquín: 18 muestras recolectadas.
- El Basurero: 8 muestras recolectadas.
- Finca Morocho: 21 muestras recolectadas.
- El Mango: 6 muestras recolectadas.
- Barrio Loja: 2 muestras recolectadas.
- Cerro Grande: 19 muestras recolectadas.

5.2. Extracción de ADN

- Hojas de *P. galapageium* muestreados
- Mortero y pistilo
- Cama de arena Multi-Blok Heater (Thermo Scientific)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)
- Cloroformo/alcohol isoamílico 24:1
- Buffer de extracción CTAB 2X
- Isopropanol 91% (Merck)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8.0)
- Tubos Eppendorf 1.5mL
- 2, B-mercaptoetanol
- Etanol 70%

5.3. Cuantificación de ADN

- ADN extraído de *Psidium guajava*
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- TE (Tris base 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0)
- NANODROP 1000 (Thermo Scientific)

5.4. Amplificación de regiones microsatélites por PCR

- ADN diluido de *Psidium galapageium* (concentración 25 ng/ μ l)
- 15 pares de primers (Tabla 1)
 - 15 primers *forward*
 - 15 primers *reverse*
- Oligonucleótidos 3'-CGGAGGGAGCGCGGT-5' marcados con fluoróforos VIC, 6FAM, NED o PET (Blackett *et al.*, 2012).

- Tubos Eppendorf 1,5mL
- Tubos Eppendorf 0,2 mL
- Tubos Eppendorf 0,6 mL
- Taq Platinum ADN Polimerasa 5U/uL (Invitrogen)
- Buffer PCR 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ 50mM (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (Invitrogen)
- dNTPs 10mM (Invitrogen)
- BSA (Thermo Fisher Scientific)
- Biometra T profesional gradient Thermocycler 554-0
- T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)

5.5. Electroforesis en geles de agarosa

- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR
- SeaKem® LE Agarosa
- SYBER® Safe DNA gel stain (Invitrogen)
- Fuente de poder EPS- 300 II (C.B.S Scientific)
- EC260M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit (C.B.S Scientific)
- TBE 10X
- TBE 1X
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- Ladder 100bp (Invitrogen)

5.6. Secuenciamiento de los individuos de *P. galapageium*

- El secuenciamiento de los individuos muestreados se realizó en Macrogen, Korea.

5.7. Genotipado

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

5.8. Análisis de datos

- Software R-studio, incluye los siguientes paquetes:
 - Paquete *adegenet*
 - Paquete *ape*
 - Paquete *pegas*
 - Paquete *ade4*
 - Paquete *diveRsity*
 - Paquete *hierfstat*
 - Paquete *ggplot2*
- Software STRUCTURE 2.3.4
- Software Google Maps

- Software Coancestry
- Software Arlequin
- Microsoft Excel

6. Métodos

6.1. Extracción de ADN

El ADN de las hojas de *P. galapageium* se extrajo utilizando el buffer CTAB de acuerdo al protocolo descrito por Sagai y Maroof (1984). Primero, se tomaron 30 mg de hoja, y se trituró con ayuda del pistilo en el mortero previamente desinfectado con etanol al 70%. Las hojas trituradas de cada individuo se colocaron en diferentes tubos Eppendorf de 1.5 ml. En estos se añadió 800 μ l de CTAB, que funciona como detergente catiónico utilizado para la extracción de ácidos nucleicos el cual se encarga de formar complejos con proteínas. Posteriormente, se agregó β - mercaptoetanol el cual se encarga de romper los puentes disulfuro que se encuentran en las proteínas. Luego, se incubó en la cámara de arena durante 1 hora a una temperatura de 62 °C, y se agitaron los tubos cada 10 minutos. Después de la incubación, se colocó 500 μ l de cloroformo- alcohol isoamílico 24:1 y se pudo observar la formación de dos fases. Una fase acuosa donde se encontraban los ácidos nucleicos y una segunda fase donde estaban las proteínas. Se dejó en reposo por 20 minutos y luego se centrifugó por 20 minutos a 13. 800 rpm. Luego, con una micropipeta se separó la fase acuosa y se colocó el líquido extraído en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se añadió alcohol isopropílico y se agitó suavemente los tubos para que el ADN precipite. Posteriormente, se centrifugaron los tubos de 2 a 5 minutos a 5000 rpm hasta obtener la formación del pellet, en el cual se encontraba el ADN. Luego, se descartó el sobrenadante y se lavó el ADN con etanol al 70% para que el pellet pueda despegarse de la pared del tubo. Se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos en la cámara de flujo laminar para que se sequen y que queden sin residuos de etanol. Finalmente, se

resuspendió el ADN en 50 µl de TE y se almacenaron los tubos a una temperatura de -20°C. Cabe recalcar que el ADN de los individuos analizados fueron extraídos por María José Pozo y Juan Delgado en el Laboratorio de Biología Molecular de Galapagos Science Center (GSC).

6.2. Preparación de muestras

Una vez que se obtuvo el ADN de las muestras se procedió a cuantificar la concentración de ADN, para verificar la calidad con respecto a la presencia de contaminantes fenólicos y proteicos mediante espectrometría con la ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Posteriormente, se realizó electroforesis en geles de agarosa al 1,5% para observar la integridad del ADN. Luego, se diluyeron las muestras a una concentración final de 25 ng/µl.

6.3. Diseño y amplificación de regiones microsatélites por PCR con primers específicos para *P.galapageium*

Se utilizaron 15 primers específicos para *P.galapageium* los mismos utilizados por el trabajo previo de Soria (2018). El diseño de los primers específicos para *Psidium galapageium* se realizó con la colaboración de la Dra. Jennifer Rowntree, Manchester Metropolitan University quien se encargó del secuenciamiento del genoma de la especie *P. galapageium*. Para el secuenciamiento de la especie *P. galapageium* se utilizó la plataforma Illumina MiSeq (Genetics Core Facility, University of Manchester). Las lecturas resultantes de esta plataforma pasaron por un proceso de selección con la herramienta Illumina, Trimmomatic v0.30 (Lohse *et al.*, 2012), luego después de un proceso de filtración y cortado se obtuvo aproximadamente de 2 x 1 783 686 lecturas. Se identificaron los microsatélites y sus regiones flanqueantes (PALs) mediante el programa PAL_finder v.0.02 (Castoe *et al.*, 2012; Griffiths, 2013). El diseño de primers se realizó mediante el programa Primer 3 (Koressaar y Remm, 2007; Untergasser *et al.*, 2012). Se

obtuvo una lista de 30 loci microsatélites de 3-4 nucleótidos, de los cuales solamente 15 fueron utilizados en este estudio.

Se procedió a la amplificación mediante la técnica de PCR con las 86 muestras de ADN de *Psidium galapageium*. Primero, de las 86 muestras seleccionadas se escogieron 3 muestras de cada una de las 7 localidades y se realizaron pruebas de pre-amplificación para verificar la temperatura adecuada de annealing y así continuar con la amplificación del resto de muestras. Para la amplificación de ADN se utilizó el programa de PCR descrito por Soria (2018) con ciertas modificaciones, para lo cual se utilizó el siguiente protocolo con un volumen final de 30 μ l con 3 μ l de ADN por reacción: Buffer de PCR 1X, 0,2 μ M de dNTPs, 2.5 mM MgCl₂ (Invitrogen, California, USA), 1 mg/L de BSA (el cual fue añadido para aumentar la actividad de la polimerasa y evitar la presencia de los inhibidores los cuales afectaban la amplificación de las muestras por PCR), 1 U de Taq Polimerasa Platinum, 0.5 mM de Primer *Reverse* y Primer marcado con uno de los cuatro fluoróforos (NED, PET, VIC, o 6FAM) (Blackett *et al.*, 2012), y 0,15 mM Primer *Forward* añadida con la cola A siguiente el protocolo de Blackett (2012). El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 segundos, con una annealing de 58°C a 65°C dependiendo del primer a amplificar por 1 minuto y 30 segundos, y finalmente un periodo de elongación a 72°C durante 2 minutos y finalmente una temperatura de extensión de 72°C por 5 minutos.

Se verificó la amplificación de cada una de las muestras con los 15 primers mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, colocando 5 μ l de producto de PCR con 3 μ l de Blue Juice 10X (Invitrogen) y 1 μ l de Ladder 100 pb, corriendo los geles a 80 voltios durante 45 minutos.

6.4. Genotipado de los individuos de *P.galapageium*

Una vez comprobada la amplificación de cada una de las muestras de *P. galapageium* se procedió al envío de placas a Macrogen, Korea. El envío de placas consistió en colocar en cada uno de los pocillos de la placa 10 ul de producto de PCR de cada reacción marcadas con fluoróforos distintos cada uno, el volumen del pocillo final fue de 40 ul. Una vez completadas las placas, con todas las muestras y todos los primers estas fueron enviadas a Macrogen, Korea para su genotipado. El genotipado se realizó mediante el secuenciador ABI3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Este secuenciador es la última generación de instrumentos de electroforesis de 4 capilares, el cual ofrece un alto rendimiento que permiten ahorrar tiempo, reducir costos y aumentar la productividad (ThermoFisher Scientific, 2018). El secuenciador ABI3130 Genetic Analyzer analiza las muestras por electroforesis capilar donde estas son separadas en varios fragmentos dependiendo del tamaño del mismo. Los fragmentos son marcados emitiendo una señal de fluorescencia por medio de un láser. Esta señal de fluorescencia se separa mediante un sistema de difracción y con la ayuda de una cámara se detecta aquella fluorescencia. La señal emitida es convertida en datos numéricos digitales los cuales se almacenarán en formato .fsa compatibles con el programa GeneMarker ® . El programa GeneMarker se utilizó para determinar los pares de bases de los alelos presentes en cada uno de los individuos mediante la visualización de picos de fluorescencia empleando como referencia el ladder presente de 500 LIZ.

6.5. Análisis de datos

Una vez que se obtuvo el tamaño de los alelos de cada uno de los individuos por localidad se realizó una matriz codominante la cual servirá para cada uno de los análisis realizados. Para la realización de la matriz diploide se utilizó el mismo criterio de estudio de *P.galapageium* de la isla Santa Cruz (Soria, 2018). En el caso de la matriz tetraploide,

hubo individuos que presentaban solamente dos alelos por locus, por lo que para formar la tetraploidía se tuvo que duplicar aquellos alelos. Cabe mencionar que los software utilizados para los análisis de los individuos muestreados de *P. galapageium* de ambas ploidías fueron los mismos.

Para el análisis de diversidad alélica y genética de *P.galapageium* se utilizó el programa R Studio (RStudio Team, 2015), el cual permitió calcular el número de alelos, heterocigosidades observadas (H_o) y esperadas (H_e) respectivamente. También, para el análisis de la distribución de la diversidad genética y estructura poblacional se utilizó el mismo programa donde se calcularon los valores F_{st} y se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con los individuos analizados en la isla Isabela, y también un Árbol Neighbor Joining. Así mismo, se determinó el número de alelos privados de cada una de las localidades.

Para el análisis de estructura poblacional se utilizó el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard, 2004), el cual se basa en un análisis de inferencia bayesiana, esto con el objetivo de determinar el número de posibles linajes (K) y determinar si existe o no estructura poblacional de *P.galapageium* en la isla Isabela. La matriz codominante diploide fue modificada a un formato .txt para que así sea compatible con STRUCTURE. Los parámetros utilizados en STRUCTURE fueron: el modelo ancestral “*admixture*” con frecuencias alélicas independientes. Es decir que este modelo asume que los genotipos de los individuos estuvieron mezclados en el pasado y que reflejan la proporción genómica heredada de sus ancestros en cada una de las K poblaciones (Juyó, 2012).

El análisis en STRUCTURE para ambos análisis se realizó en dos corridas. La primera corrida consistió en establecer un rango de K , que fue de $K=1$ a $K=10$, por 10 iteraciones con un burnin de 10000 y MCMC (Markoc Chain Monte Carlo) de 100000. Los resultados obtenidos fueron analizados en Structure Harvester (Earl y vonHold,

2012) para establecer el valor óptimo de K. Una vez que se determinó el K óptimo, se realizó una segunda corrida con un K= 1 hasta un K= 7 por 100 iteraciones con un burnin de 10000 y MCMC de 1000000. Asimismo, los resultados fueron obtenidos utilizando Structure Harvester donde este permitió determinar el K óptimo. Luego, utilizando el software CLUMPP (Jakobsson y Rosenber, 2007), se unieron todas las iteraciones de los dos mejores K obtenidos anteriormente y mediante el software distruct (Rosenberg, 2004), se obtuvo el gráfico final.

Para determinar el nivel de parentesco entre los individuos de las siete localidades se utilizó el programa Coancestry. El índice de Wang permitió determinar los coeficientes de coancestría para cada localidad en estudio (Wang, 2010). También se determinó el índice de endogamia entre los individuos de *P.galapageium* con la ayuda del programa R Studio. Por otro lado, para determinar si existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas se realizó una prueba de Mantel utilizando el software *Arlequin 3.5* (Excoffier y Lischer, 2010), así como el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) basado en 1023 permutaciones, donde proviene la mayor variación genética de las localidades analizadas utilizando el programa ARLEQUIN v.3.11. (Schneider *et al.*, 2000). El análisis del nivel de parentesco en Coancestry no se pudo realizar con los datos tetraploides debido a que el programa no reconoce este tipo de ploidía.

Para determinar la ploidía que mejor se ajusta a los datos de los individuos analizados se realizó una prueba Likelihood Ratio Test o por sus siglas en inglés LTR. Esta prueba se basa en la diferencia de la función de log-Likelihood máximo $l(\theta) = \ln L(\theta / y_1, \dots, y_n)$ evaluada en $\theta = \hat{\theta}$ y cuando es evaluada como valor nulo $\theta = \theta_0$. Donde se comparó una hipótesis nula $H_0: \theta = \theta_0$ versus una hipótesis alternativa $H_A: \theta \neq \theta_0$ (Winner, 2017).

H_0 : el modelo diploide no se ajusta mejor a los datos analizados comparados con el modelo tetraploide.

H_A : el modelo diploide se ajusta mejor a los datos analizados comparados con el modelo tetraploide.

Para esto se utilizaron los valores log Likelihood que fueron arrojados por el software Structure Harvester de la última corrida tanto del análisis diploide como del tetraploide. El valor con mayor Likelihood pertenece al modelo que mejor se ajustan los datos, sin embargo para comprobarlo estadísticamente se debe calcular el valor X_{LR}^2 . Por medio de la fórmula de LTR (Anexo 2) se determinó el valor X_{LR}^2 , que fue comparado con un valor $X_{\alpha;gl}$ junto con un valor p , y en función del resultado se aceptará o se rechazará la hipótesis nula planteada (Winner, 2017). Cabe mencionar que el modelo bajo el cual se realizó este análisis fue un modelo estructural no anidado (modelo ancestral admixture) el cual asume que los individuos estuvieron mezclados entre sí en el pasado (Wen, 2002).

7. Resultados

7.1. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo ADN de 86 muestras de *P. galapageium* colectadas en la isla Isabela en 7 localidades. Los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN empleando el NANODROP100 (Termo Fisher Scientific) arrojó valores deseados en los radios de absorbancia 260/230 alrededor de 2.0 y en el radio de 260/280 valores alrededor de 1.8 para la gran mayoría de las muestras (Anexo 3). Los geles de agarosa al 1,5% realizados permitieron visualizar una banda clara de alto peso molecular y con esto se pudo verificar la integridad del ADN genómico.

7.2. Amplificación de regiones microsatélites

Se logró obtener una amplificación con todas muestras analizadas de *P. galapageium* con los 15 pares de primers homólogos considerados en este estudio con cada uno de los fluoróforos descritos (Tabla 1) (Figura 3). Las temperaturas de annealing estandarizadas para las reacciones de PCR en la mayoría de los primers fue de 65°C.

7.3. Genotipado de los individuos de *Psidium galapageium*

Se genotiparon 86 individuos de *Psidium galapageium* con los 15 marcadores microsatélites. Se obtuvo un total de 52 individuos que presentaron más de dos alelos por locus repartidos entre los siguientes primers GYB4 (1 individuo) GYB6 (1 individuo), GYB9 (19 individuos), GYB14 (5 individuos), GYB25 (26 individuos) (Tabla 2) (Anexo 4 y 5). El resto de individuos con el resto de marcadores tuvieron solamente dos alelos por locus (Tabla 2) (Anexo 5 y 6).

7.4. Análisis de Datos (2n)

7.4.1. Diversidad alélica y genética

Existen diferentes índices para determinar la diversidad alélica de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela, en este estudio los parámetros utilizados fueron el número de alelos obtenidos del genotipado de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela, el número de alelos encontrados en cada localidad estudiada, número de alelos privados o exclusivos, así como también los índices de heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) (Tabla 3).

En los individuos de *P. galapageium* genotipados en la isla Isabela se obtuvo un total de 164 alelos. Como se puede observar en la Tabla 3 la mayor cantidad de alelos se encontró en las localidades de Barrio Loja (105 alelos), El Basurero (86 alelos) y San Joaquín (83 alelos) y la localidad que tubo un bajo número de alelos fue Cerro Grande (34 alelos). En cuanto a los alelos privados, en toda la población de *P. galapageium* en la isla Isabela se obtuvo 62 alelos, la localidad con el mayor número de alelos privados es San Joaquín (23 alelos privados), seguido por Cerro Grande (15 alelos privados) y la localidad con el menor número de alelos privados fue El Mango (1 alelo privado).

La heterocigosidad esperada (H_e) global de los individuos analizados de *P. galapageium* fue de 0,732 mientras que la heterocigosidad observada (H_o) global fue de 0,748. Se utilizó el índice de heterocigosidad esperada ya que este permite estimar la diversidad genética de los individuos analizados. Cuando la heterocigosidad esperada es cercana a 1, indica que hay mayor diversidad genética, mientras que si este valor es cercano a 0 indica que hay menor diversidad (Nei, 1978). Por lo que se sugiere que la diversidad genética de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela obtenida en este estudio es moderadamente alta ($H_e=0,732$). En cuanto a la heterocigosidad esperada obtenida en las localidades, el mayor valor fue de San Joaquín

($H_e=0,74$) mientras que la localidad que tuvo una menor heterocigosidad esperada fue Barrio Loja ($H_e=0,46$).

7.4.2. Distribución de la diversidad

Para observar el agrupamiento de los individuos de acuerdo a su diversidad genética se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), donde se puede observar que no hay agrupaciones definidas en el plano. Sin embargo, si se realiza un análisis más profundo se puede ver que hay una tendencia de los individuos tanto de San Joaquín como de Cerro Grande en agruparse solamente en el lado derecho del cuadrante (Figura 4). También se calcularon los valores F_{ST} con el objetivo de conocer el nivel de diferenciación genética de los individuos de *P.galapageium* analizados en la isla Isabela. Este valor va en un rango de 0 a 1 donde los valores cercanos a 1 indican una alta diferenciación genética y bajo flujo génico mientras que los valores cercanos a 0 indican baja diferenciación genética y alto flujo génico (Ortega *et al*, 2015). En base a los resultados obtenidos el valor de F_{ST} global fue de 0.066 por lo que al ser cercano a 0 se puede decir que en los individuos de *P. galapageium* existe una baja diferenciación genética y alto flujo génico. Los valores F_{ST} también fueron calculados entre las localidades analizadas y se obtuvieron valores en un rango de 0.037 hasta 0,079 (Tabla 4). La mayoría de valores F_{ST} obtenidos entre las localidades fueron cercanos a 0 a excepción de las localidades de San Joaquín vs El Mango y El Basurero ($F_{ST} = 0,079$ y 0.064 respectivamente) y Cerro Grande vs El Mango y El Basurero ($F_{ST} = 0.073$ y 0.067 respectivamente) que fueron las que mayor valor obtuvieron con respecto al resto.

En base a los resultados obtenidos en el dendograma Neighbor Joining (Figura 5) el cual se representan las distancias genéticas de los individuos de las siete localidades por medio de la profundidad de las ramas. Se puede observar que la rama más profunda pertenece a los individuos de la localidad El Mango, seguido de los individuos de la

localidad El Basurero por lo que se puede decir que los individuos de estas localidades (ubicadas en la zona de transición) se encuentran genéticamente mucho más distantes en relación al resto de individuos de las otras localidades. Así mismo, el valor de F_{st} calculado entre estas localidades de la zona de transición (El Mango y El Basurero) tienen los valores más alto de F_{st} de todos los valores obtenidos con respecto a las dos localidades que se encuentran en la zona Scalesia (Figura 2), sugiriendo que hay una moderada diferenciación genética entre los individuos de las localidades de la zona Scalesia con los individuos de las localidades de la zona de transición.

Para determinar si existe una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas se realizó una prueba de Mantel utilizando el software Arlequin (Legendre y Fortin, 2010). En base a los resultados obtenidos se obtuvo un coeficiente de regresión ($R^2 = 0,00$) el cual al ser 0 este indica que no existe una correlación entre las distancias genéticas y geográficas. El valor p ($p=0,77$) mayor al nivel de significancia de 0,05 obtenido corrobora lo dicho por lo que no se evidencia ninguna relación.

Para determinar de dónde proviene la mayor variación genética se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y se pudo determinar que la mayor variación genética proviene dentro de las poblaciones con un 99,5% y la variación entre las poblaciones con un 0,05%.

7.4.3. Análisis de la estructura poblacional

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de estructura poblacional en función al análisis de inferencia bayesiana en STRUCTURE el K óptimo obtenido fue de $K= 3$ ($\Delta K =127,827$). En base al K óptimo obtenido se puede determinar que existen tres linajes o acervos genéticos representados por los colores verde, azul y rojo que están aportando genéticamente a la mayoría de individuos de *P.galapageium* de la isla Isabela (Figura 6). Asimismo, se puede observar que los individuos de la localidad de Cerro

Grande presentan una mayor proporción del linaje de color azul, así como los individuos de la localidad de San Joaquín tienen un mayor aporte del linaje color verde. Mientras que los individuos de las localidades del El Mango, El Basurero, Ricardo García y Barrio Loja ubicados en la zona de Scalesia tienen una mayor proporción del linaje color rojo. Al tener todos los individuos una proporción variada de los diferentes acervos genéticos se sugiere que se evidencia una estructura poblacional poco definida.

7.4.4. Análisis de endogamia y parentesco

Adicionalmente, se realizaron varios análisis para determinar si en la población de *P. galapageium* de la isla Isabela existe endogamia y parentesco. Dentro de los índices que nos permite determinar si existe o no endogamia se encuentra el índice F_{IT} y F_{IS} y el valor F promedio. Los tres coeficientes se miden en un rango de 0 a 1, donde valores cercanos a 0 indica que no existe endogamia entre los individuos de una población, mientras que los valores cercanos a 1 indican un alto nivel de endogamia en los individuos (Eguiarte y Souza, 2010). En el histograma se puede observar que la mayor proporción de individuos se encuentran en valores de coeficientes F de 0.05 a 0.30, a excepción de un individuo de la localidad de Finca Morocho que presenta un índice de endogamia diferente del resto (0,4) por lo que quiere decir que existe una probabilidad del 40% de que aquel individuo haya pasado por eventos de endogamia en el pasado (Figura 7). Con respecto a los índices F_{IT} y F_{IS} se obtuvieron valores negativos ($F_{IT} = -0,007$ y $F_{IS} = -0.079$). Al ser estos valores muy bajos se sugiere que no existe endogamia entre los individuos de *P. galapageium* analizados en la isla Isabela.

Se realizó un análisis para determinar el nivel de parentesco entre los individuos de *P. galapageium* estudiado de la isla Isabela con el software Coancestry. Para esto se calculó el coeficiente de coancestría o índice de Wang (2010), donde los valores negativos o cercanos a 0 indican que no existe parentesco alguno, mientras que los valores positivos

cercanos a 1 presentan un nivel de parentesco. En cuanto a los resultados de coancestría se obtuvo un valor promedio de 0,0142. (Tabla 5).

7.4.5. Análisis comparativo de diversidad genética entre individuos de *P.galapageium* en la Isla Santa Cruz e Isabela

Otro punto que se analizó fue la diversidad alélica y genética de los individuos de *P. galapageium* analizados de la isla Isabela con respecto a los índices obtenidos de los individuos de la isla Santa Cruz. En cuanto a la diversidad alélica, se obtuvo un mayor número de alelos en la isla Isabela (Isabela= 164 alelos, Santa Cruz = 99 alelos) (Tabla 6). Entre las dos islas hubo un total de 65 alelos compartidos, mientras que el resto de alelos fueron exclusivos de cada una (Isabela= 62 alelos privados, Santa Cruz = 28 alelos privados) (Tabla 7). En cuanto a la diversidad genética, los valores obtenidos en la heterocigosidad esperada en la isla Isabela fue mayor ($H_e = 0.73$) mientras que la heterocigosidad esperada en Santa Cruz fue un poco menor ($H_e = 0.61$) (Soria, 2018).

Asi mismo, se calcularon los valores pairwise F_{st} entre las dos islas siendo este valor de 0.875 (Tabla 8) por lo que se considera que existe una moderada diferenciación genética entre los individuos analizados de *P. galapageium* de la isla Isabela con los individuos de Santa Cruz, estudiados previamente por Soria (2018).

7.5. Análisis de Datos (4n)

7.5.1. Diversidad genética y alélica de *P. galapageium*

En los individuos genotipados de *P. galapageium* en la isla Isabela tomando en cuenta cuatro alelos por locus, se obtuvo un total de 189 alelos, con un promedio de 2 a 20 alelos por locus. Se puede observar que la localidad con un mayor número de alelos fue Cerro Grande (121 alelos), seguido por Finca Morocho (96 alelos), y Barrio Loja (95). La localidad con un menor número de alelos fue San Joaquín con 37 alelos. En cuanto a los alelos privados, en la población de *P.galapageium* en la isla Isabela se obtuvo 82 alelos,

la localidad con el mayor número de alelos privados es San Joaquín (31 alelos privados), seguido por Cerro Grande (19 alelos privados) y la localidad con el menor número de alelos privados fue Barrio Loja y El Mango (2 alelos privados cada uno) (Tabla 9).

La heterocigosidad esperada (H_e) global de los individuos analizados de *P.galapageium* fue de 0.657. La diversidad genética de los individuos estudiados de *P.galapageium* en Isabela con ploidía $4n$ es moderadamente alta. En cuanto a la heterocigosidad esperada obtenida en las localidades, el mayor valor fue de San Joaquín ($H_e = 0.75$) mientras que la localidad que tuvo una menor heterocigosidad esperada fue Barrio Loja ($H_e = 0.48$).

7.5.2. Distribución de la diversidad

Los resultados obtenidos en el Análisis de Coordenadas Principales PCoA fueron similares a los realizados con el análisis diploide. Se puede observar que los individuos no forman grupos completamente definidos (Figura 8). Sin embargo, si se observa de una manera más profunda, los individuos de las localidades de El Mango, El Basurero y Barrio Loja (localidades ubicadas en la zona de transición) tienden agruparse al lado izquierdo del plano y los individuos del resto de localidades (Finca Morocho, Cerro Grande y San Joaquín) se encuentran distribuidos en todo el plano.

En base a los resultados obtenidos el valor de F_{ST} global fue de 0.068 por lo que al ser cercano a 0 se puede decir que en los individuos estudiados de *P. galapageium* en la isla Isabela existe una baja diferenciación genética y alto flujo génico. También se calcularon los valores pairwise F_{ST} entre los individuos estudiados de *P. galapageium* de las localidades analizadas en la isla Isabela y se obtuvieron valores F_{ST} en un rango de 0.032 hasta 0.088 (Tabla 10). La mayoría de valores F_{ST} obtenidos entre las localidades fueron cercanos a 0 a excepción de las localidades de San Joaquín vs El Mango y El Basurero ($F_{ST} = 0.088$ y 0.074 respectivamente) así como también Cerro Grande vs El

Mango y El Basurero ($F_{ST} = 0.086$ y 0.068 respectivamente) que fueron las que mayor valor obtuvieron con respecto al resto.

Con respecto al dendograma Neighbor Joining (Figura 9), se puede observar que las ramas más profundas representan a los individuos de la localidad de El Mango y Barrio Loja; por lo que aquellos individuos se encuentran genéticamente mucho más distantes con respecto al resto de individuos de las demás localidades. Esto se puede corroborar con los valores F_{ST} calculados. Los valores F_{ST} obtenidos de estas dos localidades (El Mango y El Basurero) con respecto al resto de localidades son los valores más altos, sugiriendo que hay una alta diferenciación genética entre los individuos de estas dos localidades (El Mango y El Basurero) con los individuos de las otras localidades.

Para determinar de dónde proviene la mayor variación genética se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) y se pudo determinar que la mayor variación genética proviene dentro de las poblaciones con un 68,1% y la variación entre las poblaciones con un 25,96%.

7.5.3. Análisis de estructura poblacional

En cuanto a los resultados obtenidos en el análisis de estructura poblacional en STRUCTURE el K óptimo obtenido fue de $K= 2$ ($\Delta K = 792.50$). En base al K óptimo obtenido se pudo determinar que existen dos linajes o acervos genéticos (Figura 10) representados por los colores verde y rojo que están aportando genéticamente a los individuos de *P.galapageium* de la isla Isabela. Así mismo, se puede observar que los individuos de la localidad de Cerro Grande y San Joaquín presentan una mayor proporción del linaje de color verde. Mientras que los individuos de la localidad Barrio Loja y El Mango tienen una mayor proporción del linaje color rojo. Al tener todos los individuos una proporción variada de los diferentes acervos genéticos se sugiere que existe una estructura poblacional poco definida.

7.5.4. Análisis de endogamia

Los índices que se tomaron en cuenta para determinar si hay o no endogamia son F_{IT} y F_{IS} y el valor F promedio. En el histograma (Figura 11) se puede observar que la mayor proporción de individuos se encuentran en valores de coeficientes F de 0.1 a 0.30. Con respecto a los índices F_{IT} y F_{IS} se obtuvieron valores negativos ($F_{IT} = -0,0062$ y $F_{IS} = -0.101$). Al ser estos valores muy bajos se sugiere que no existe endogamia entre los individuos de *P.galapageium* en la isla Isabela tomando en cuenta la tetraploidía.

7.6. Comparación de ploidías

Los valores de log Likelihood obtenidos del software Structure Harvester para diploide y tetraploide fueron 325.0 y 206.4 respectivamente. Sugiriendo que el modelo diploide se ajusta mejor a los datos analizados. Para corroborar estadísticamente lo mencionado, se calculó el valor X_{LR}^2 , que fue de 237.2. La prueba LTR sigue el modelo de chi-cuadrado por lo que se debe calcular un valor p para estimar el coeficiente $X_{\alpha,gl}$, donde α es nivel de significancia (probabilidad de que la hipótesis nula sea verdadera), en este caso se usó un alpha del 0.05% (Moreira, 2003) y gl (grados de libertad), es el número de parámetros diferentes en cada ploidía. En este caso el parámetro diferente es el número de alelos por lo que los grados de libertad serían 2 ($gl: 4 - 2 = 2$). El valor p obtenido del valor crítico de la prueba de relación de probabilidad fue de 7.13 (Moreira, 2003). Una vez obtenido el valor p , se calculó $X_{\alpha,gl} = 5.99$ siendo este valor menor que el valor X_{LR}^2 ($X_{LR}^2 > X_{0.05;2}$) y el valor de chi cuadrado calculado es mayor que el chi cuadrado crítico ($7.13 > 5.99$); por lo que se rechaza la hipótesis nula (Winner, 2017).

8. Discusión

8.1. Análisis de Datos ploidía 2n

8.1.1. Diversidad alélica de *P. galapageium*

La cantidad de diversidad genética dentro de las poblaciones es un parámetro fundamental en la biología evolutiva y de conservación. Se espera que los altos niveles de variación genética aumenten el potencial de las poblaciones para responder a la selección y mantener el fitness de los individuos. La medida más simple de la diversidad genética en un locus es el número de alelos (riqueza alélica) (Caballero y García, 2013).

En la población estudiada de *Psidium galapageium* en la isla Isabela se encontró un total de 164 alelos en 86 individuos utilizando 15 marcadores microsatélites específicos para *P. galapageium*. Se obtuvo un promedio de 2-23 alelos por locus. Así mismo se obtuvo un total de 62 alelos exclusivos para la población (Tabla 2). Estos alelos se denominan privados ya que son exclusivos de un determinado lugar de una población (Szpiech y Rosenberg, 2011). Además, el número de alelos privados se puede usar como un indicador de la cantidad de flujo de genes entre las subpoblaciones o localidades en estudio (Caballero y García, 2013). La localidad con mayor número de alelos privados fue San Joaquín (23 alelos privados) y la localidad con menor número de alelos privados fue El Mango (1 alelo privado) seguida de Barrio Loja (2 alelos privados) y El Basurero (5 alelos privados), esta pequeña cantidad de alelos privados significa que existe un flujo génico entre los individuos de estas localidades (Valle *et al.*, 2011). Así mismo estos alelos privados podrían estar relacionados con características morfológicas y fisiológicas de los individuos que posiblemente les ha permitido adaptarse a las zonas en las que se encuentran (Mboup *et al.*, 2012).

El guayabillo al ser una especie endémica de las Islas Galápagos no es muy estudiado, por lo que son muy pocos los estudios de diversidad de esta especie. Sin

embargo, se ha realizado un estudio preliminar de la población de *P.galapageium* en la isla Santa Cruz. Al comparar los dos estudios, el número de alelos encontrados en la isla Isabela fue mayor al reportado en *P.galapageium* en la isla Santa Cruz (Soria, 2018), en el cual se obtuvo 99 alelos con primers específicos para la especie. Esta diferencia en el número de alelos obtenidos en los dos estudios de la misma especie en diferentes islas puede estar relacionado con el muestreo intensivo de la población de *P. galapageium*. En un estudio Szpiech y Rosenberg (2011) mencionan que el muestreo intensivo de las poblaciones puede reducir el número de alelos; por lo tanto, una región que ha sido muestreada intensamente puede tener menos alelos que una región muestreada menos intensamente.

8.1.2. Diversidad genética de *P.galapageium*

El análisis de la diversidad genética es una de las herramientas más utilizadas que permiten explicar parte de la historia evolutiva de una especie, así como su supervivencia a largo plazo (Torres y Gutiérrez, 2018). La diversidad genética hace referencia a la variedad de genotipos que puede ocurrir en un individuo, en los individuos de una población y entre las poblaciones de una especie (Rimieri, 2017). Dentro de los índices que permiten estimar la diversidad genética se encuentra la heterocigosidad, la diversidad alélica y los polimorfismos presentes en la especie en estudio. Estos análisis son importantes ya que permiten tener un seguimiento del cambio de los alelos a través del tiempo con el objetivo de evaluar factores externos que podrían estar afectando la viabilidad de la población (Borges *et al.*, 2012).

Uno de los índices que se mencionó fue la heterocigosidad, que significa la frecuencia de heterocigotos para un locus en particular (Levin, 1975). Si el índice de heterocigosidad es cercano a 1 quiere decir que hay mayor diversidad genética, es decir mayor número de individuos heterocigotos por locus, mientras que si el valor es cercano

a 0 existe menor diversidad genética, por lo que hay un menor número de individuos heterocigotos (Allendorf, 1986). En base a los resultados obtenidos en este estudio se obtuvo una heterocigosidad esperada de 0.732 por lo que se puede decir que la diversidad genética de *P. galapageium* en la isla Isabela es moderadamente alta. En un estudio en las islas Canarias, donde se determinó la diversidad genética de la especie endémica *Chamaecyissus proliferus* donde se obtuvo un valor de $H_e = 0,67$ y ésta es reportada como moderadamente alta (Ortega *et al.*, 2015).

Así mismo, al analizar las heterocigosidades esperadas de cada una de las localidades en estudio se evidenció que fueron moderadamente altas ($H_e = 0,46 - 0,74$). La localidad con menor heterocigosidad fue “Barrio Loja” en relación al resto de localidades. Una de las posibles explicaciones de la disminución de la heterocigosidad es el número de individuos muestreados en esa zona, así como el efecto que puede estar ocasionando la planta invasora *P. guajava* en esa zona, como se ha reportado en otros estudios de diversidad genética. Debido a que la guayaba es una de las especies de plantas responsables de las alteraciones del hábitat en grandes porciones de las Islas Galápagos y del desplazamiento general de especies locales endémicas como el guayabillo (Torres y Gutiérrez, 2018).

En cuanto a los análisis de heterocigosidad global esperada y observada, la heterocigosidad esperada ($H_e = 0,732$) fue ligeramente menor que la observada ($H_o = 0,748$) en *P. galapageium* en la isla Isabela. Esta ligera disminución puede estar explicada por el tipo de reproducción del guayabillo así como la probabilidad de que existan eventos de autopolinización en esta especie. Sin embargo, el tipo de reproducción del guayabillo no ha sido estudiado a profundidad (Rentería *et al.*, 2007). Si se compara la heterocigosidad esperada obtenida en este estudio con la heterocigosidad esperada de su especie congénere *P. guajava* en la misma isla, esta fue mucho más baja que la especie

endémica ($H_e = 0,284$). Esta gran diferencia de diversidad se debe a que la guayaba es una especie introducida, traída desde el continente hasta el Archipiélago, así como por la forma de reproducción y el efecto fundador que tiene esta especie lo que hace que su diversidad disminuya (Stuessy *et al.*, 2014).

8.1.3. Flujo génico de *Psidium galapageium* en la isla Isabela

El flujo de genes en las plantas hace referencia al movimiento de genes entre las poblaciones por apareamiento, migración de semillas o propágulos vegetativos, y esto a su vez permite el ingreso de alelos nuevos a la población así como también el cambio en la frecuencia de los alelos presentes (Slatkin, 1985). El flujo genético en las plantas es idiosincrásico, ya que varía mucho entre especies, poblaciones y estaciones. Sin embargo, los niveles de flujo de genético a distancias de aislamiento ocurre de cientos a miles de metros, como sucede con poblaciones de plantas en las islas son con frecuencia lo suficientemente altos como para contrarrestar la deriva genética. Este flujo genético puede ocurrir a velocidades significativas y a distancias impresionantes (Ellstrand y Elam, 1993). Por lo tanto, el flujo genético es uno de los factores indispensables en la evolución como también en la genética de conservación de plantas, ya que la presencia de flujo de genes tiene un papel importante en la determinación del destino genético de la población (Ellstrand, 1992).

Uno de los índices que permiten estimar el flujo genético es el valor F_{st} , es un valor que evalúa el nivel de diferenciación genética en la población de estudio (Bowman, 1966). En cuanto a los resultados obtenidos se evidenció que el flujo génico presente entre los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela es alto, debido a que los valores de F_{st} global y los valores *pairwise* F_{st} son bajos (Tabla 4). Este valor fue similar en el estudio reportado por Soria (2018) donde se obtuvo un F_{st} de 0,06 y donde los valores

pairwise Fst eran muy cercanos a cero (0.02-0.11), en el cual indica una baja diferenciación genética y alto flujo genético.

Así mismo el valor *Fst* permite estimar el valor Nm (número de migrantes), el cual es uno de los métodos indirectos para estimar el flujo genético. Valores de Nm menores a 1 predomina la deriva génica, mientras que valores mayores a 1 predomina el flujo genético (Uribe, 2014). El valor Nm obtenido fue superior a 1 (Nm= 7.07) (Anexo 7) , por lo que se puede decir y corroborar el alto flujo genético entre los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela.

Existen varios factores que pueden contribuir el alto flujo genético, uno de los más importantes son los dispersores de semillas que se encuentran en la isla. Existen dos clases de vertebrados que tienen una relevancia particular en cuanto a la dispersión de semillas en las islas oceánicas, estas son las aves y reptiles. Una de las aves que causa la mayor dispersión de semillas en el Archipiélago son las aves frugívoras, como los cucuves (*Mimus spp.*), así como muchas aves granívoras (pinzones) e insectívoras (*Myiarchus magnirostris*). Sin embargo dentro de todos los dispersores de semillas se destacan los reptiles, como la tortuga gigante (*Chelonoidis nigra*) y los lagartijas de lava (*Microlophus spp.*) (Jaramillo y Heleno, 2012). Estos dispersores de semillas son los encargados de que las semillas tanto del guayabillo como de otras especies viajen de un lado al otro sobre todo en la parte sur de la isla Isabela. Comparando el flujo genético con la especie emparentada, la guayaba, en el estudio reportado por Espín (2018) *P. guajava* tuvo un valor similar ($F_{st} = 0.040$) donde también hay un alto flujo genético y que a su vez este puede deberse al movimiento de semillas por parte de los animales principalmente por tortugas y aves (Blake *et al.*, 2012). En un estudio realizado por Buddenhagen y Jewell (2006) se identificaron varias especies de aves del Archipiélago que son los principales dispersores tanto de la guayaba como del guayabillo. Algunas aves como el cucuve de

Galápagos (*Nesomimus parvulus*) y el pinzón *Certhidea olivácea* engullen la fruta entera, mientras que especies como *Crotophaga ani* y los pinzones de tierra (*Geospiza sp.*) trituran la semilla.

8.1.4. Distribución de la diversidad genética de *P. galapageium*

Para conocer la distribución de la diversidad es importante determinar donde se encuentran ubicadas las localidades de muestreo. Las localidades de Cerro Grande y San Joaquín se encuentran en una zona de Scalesia a una altitud de 220 a 330 msnm aproximadamente. Mientras que los individuos de guayabillo analizados de las localidades de El Mango, El Basurero, Ricardo García, y Barrio Loja se encuentran en una zona de Transición a una altitud de 30 a 220 msnm aproximadamente. Conocer la distribución de la diversidad dentro y entre las poblaciones de una especie es importante para la conservación, ya que proporciona directrices útiles para la preservación de la diversidad genética de la especie (Ellstrand y Elam, 1993). En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) realizado para los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela se puede observar una tendencia en los individuos de las localidades de Cerro Grande y San Joaquín a agruparse solamente en el cuadrante derecho del plano (Figura 4). Mientras que el resto de individuos de las otras localidades se encuentran distribuidas por todo el plano.

Lo obtenido en el PCoA se puede respaldar con el dendograma NJ el cual refleja el promedio de las distancias genéticas de Nei que existen entre los individuos de las localidades en estudio. En base a la longitud de las ramas se puede determinar si existe una mayor separación entre los individuos (Figura 5). Los individuos de las localidades de El Basurero, El Mango y Barrio Loja presentaron ramas marcadamente largas y son los individuos que se encuentran dispersos por todo el plano en el PCoA (Figura 4). Esto

significa que los individuos de estas localidades podrían ser genéticamente más distantes a los individuos del resto de localidades (Cerro Grande y San Joaquín).

También se realizó una prueba de Mantel para ver si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas. El valor p obtenido fue alto (0,78) por lo que se rechaza la hipótesis que mientras más distantes geográficamente son genéticamente más diferentes. Debido a esto, una posible hipótesis para explicar esta diferenciación genética entre los individuos de las localidades de ambas zonas de estudio donde se encuentran los individuos de guayabillo analizados son los gradientes altitudinales, diferentes tipos de suelo y condiciones climáticas que estos a su vez crean microambientes o zonas en una misma área geográfica de la isla Isabela (Velásquez *et al.*, 2012). La distribución de la vegetación muestra una dependencia directa de la altitud, la pendiente, la exposición a los vientos y el nivel de humedad del aire (Adelinet *et al.*, 2007).

Uno de los factores que más influye es el nivel de precipitación que varía en función de la altura. Se ha reportado que la precipitación media anual en el Archipiélago varía desde 500 mm en la costa (tierras bajas) hasta 1.500 a 2.000 en tierras altas por encima de los 300 msnm. La lluvia puede cuadruplicarse durante los años de El Niño. Como consecuencia, los suelos en las tierras altas y bajas de las islas son diferentes en su espesor, estructura y composición (Adelinet *et al.*, 2007; Stoops, 2013). De acuerdo con los datos geográficos tomados en la recolección de muestras, se evidenció que los individuos de las localidades ubicados en la zona de transición iban desde los 100 hasta los 200 msnm, mientras que los individuos de las localidades de la zona Scalesia se sitúan alrededor de los 300 a 400 msnm (Anexo 3). Es por esta razón que las condiciones climáticas en ambas zonas podrían generar estas diferencias genéticas a lo largo del tiempo entre los individuos de *P. galapageium* analizados.

También se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para determinar de donde proviene la mayor parte de la variación genética y se determinó que se encuentra dentro de las poblaciones (99,95%). Esto podría estar explicado posiblemente porque los individuos de *P. galapageium* analizados se encuentran en un continuo intercambio de genes. El AMOVA también se podría relacionar con los F_{st} obtenidos, ya que al tener F_{st} bajos también sustenta que la variación se encuentre dentro de las poblaciones y el alto flujo génico entre los individuos analizados (Mermaids, 2006). Esta variación dentro de las poblaciones así mismo podría estar relacionado con las diferentes especies dispersoras de las semillas de *P. galapageium* en las diferentes zonas. Una de estas especies dispersoras podría ser los pinzones de Galápagos, estos digieren el 90% del polen ingerido tanto de semillas endémicas como de introducidas (Jewell, 2006). Sin embargo no hay un estudio sobre especies dispersoras de guayabillo por lo que se recomienda realizar un estudio de las especies dispersoras de las semillas del guayabillo para complementar este análisis.

8.1.5. Análisis de la estructura poblacional

El análisis de estructura poblacional permite tener una idea sobre la historia evolutiva de *P. galapageium*, lo cual es interesante ya que no hay estudios previos sobre esta especie en la isla. Para determinar si existe o no estructura en los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela se realizó un análisis de estructura poblacional. Este análisis se realizó en el software Structure, utilizando el método de inferencia bayesiana (Pritchard *et al.*, 2004). En base a los resultados obtenidos, el K óptimo fue de 3 ($\Delta K = 127,83$) (Figura 6), donde se puede observar que existen tres linajes o acervos genéticos los cuales están representados por los colores azul, verde y rojo que se encuentran contribuyendo a los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela.

Se puede observar claramente que hay una mayor contribución del linaje color rojo en los individuos de las localidades que se encuentran en la zona de Transición (El Mango, Barrio Loja, El Basurero, Ricardo García y Finca Morocho), mientras que los individuos de las localidades que se encuentran en la zona de Scalesia tienen una mayor contribución del linaje de color azul en Cerro Grande y verde en San Joaquín. Por lo que se sugeriría una leve diferenciación genética entre los individuos de las localidades de la zona de transición como los de la zona de Scalesia. La diferencia de contribución por parte de cada acervo genético puede deberse a los microambientes en los que se encuentran o en el que se han adaptado los individuos o a su vez por eventos climáticos que pudieron haber ocurrido en el pasado (Humme, 1993). En un estudio realizado por Collins *et al* (2013) se reporta que el Archipiélago atravesó por una gran sequía, lo cual causó un cambio directo sobre la vegetación, así como también la aridez y oxidación del suelo aumento tanto en las zonas altas como bajas de las islas. Así mismo al haber un predominio del acervo rojo en los individuos de las localidades de la zona de transición, a diferencia de los individuos de las localidades de la zona Scalesia se podría sugerir que los individuos de cada zona se adaptaron de diferente manera en la zona en la que se encontraban.

Como se mencionó anteriormente, la isla se encuentra dividida en seis zonas, donde la precipitación, humedad y pH del suelo cambia en función de la altura. Los individuos que ocupan tierras bajas de la isla (El Mango, El Basurero, Barrio Loja y Ricardo García) se encuentran en la zona II. Esta zona es una zona de transición donde la mayor parte del suelo corresponde a grandes extensiones de rocas de lava, el pH es básico, llena de bases saturadas, hay una gran cantidad de hierro, magnesio y calcio, y la precipitación es menor (Velásquez *et al.*, 2012). A diferencia de los individuos de la localidad de Cerro Grande que se encuentran a una altitud de 250 msnm, donde forma

parte del inicio de la zona III o zona scalesia, teniendo una mayor aportación del linaje azul. Esta zona viene a ser otro microambiente completamente diferente al de la zona I (Adelinet *et al.*, 2007). Algo diferente es que los individuos de la localidad de San Joaquín presentan una mayor contribución del acervo verde, esto puede deberse a que es la localidad más alta a nivel del área de estudio (380 msnm) por ende la humedad y precipitación en esta zona es mucho mayor que en el resto de zonas. Los individuos de la localidad de Finca Morocho tienen contribución igual de los tres linajes, una posible explicación a esto es que al estar esta localidad en la mitad de las dos zonas mencionadas anteriormente, los individuos de Finca Morocho reciben genes tanto de los individuos de zonas bajas como de los individuos de zonas altas de la isla.

Este proceso de adaptación de los individuos ubicados en estas dos grandes zonas también pudieron haber generado una presión selectiva sobre ciertos alelos. Lo cual pudo cambiar el genotipo de los individuos tanto de la zona de transición como los de la zona de scalesia, permitiendo que exista una mayor adaptación a las condiciones presentes en cada zona. Sin embargo, para probar esta hipótesis se requiere de estudios mucho más profundos de historia evolutiva así como análisis fisiológicos y fenotípicos de los individuos analizados de *P. galapageium*. También se podría sugerir un estudio del proceso de adaptación de una planta *Psidium* endémica (guayabillo) así como también una *Psidium* introducida (guayaba) para comprender este tema de la adaptación de ambas especies en un mismo lugar.

Así como por ejemplo, en un estudio realizado por Huber *et al* (2004) analizan el efecto de las condiciones ambientales en *Impatiens capensis* donde se determinó que la disponibilidad de los recursos ambientales tales como la lluvia, componentes y nutrientes del suelo, etc. que varía en función de la altitud afectan directamente a la especie, y permiten que estas a su vez desarrollan ciertas características y rasgos para el entorno

competitivo que experimentarán. Como consecuencia, las plantas de *Impatiens capensis* deben tener una condición física menor en los ambientes húmedos, mientras que las plantas de *Impatiens capensis* ubicadas en microambientes secos deben tener una condición física relativamente mayor.

En resumen, existe una leve diferenciación de las localidades ubicadas en ambas zonas, sin embargo no se puede decir que hay una estructura poblacional definida en la población de *Psidium galapageium* en la isla Isabela. Aún no se han realizado estudios comparativos interinsulares de las zonas de suelos, nichos micro ecológicos y de los ciclos de vida entre las especies de las Islas Galápagos, por lo que la delimitación de las zonas descritas hasta el momento, así como el reconocimiento de las subdivisiones o modificaciones de estas zonas, surgirán solo de estudios posteriores en el campo y el laboratorio.

8.1.1. Análisis endogamia y parentesco

La endogamia es el apareamiento de individuos relacionados. En las plantas, la endogamia comúnmente ocurre de dos maneras: a través de la autofecundación o a través de la endogamia biparental, este apareamiento genera un incremento en el número de individuos homocigotos en la población (Archie, 1985). Para determinar si existe endogamia en los individuos de *P.galapageium* analizados en la isla Isabela se calculó el coeficiente promedio F (Archie, 1985).

En cuanto a los resultados obtenidos de endogamia, se pudo determinar que el coeficiente promedio de endogamia F va de 0.1 a 0.15. Se puede observar en el gráfico (Figura 7) que la mayoría de individuos se encuentran en el rango de 0.05 a 0.20, y tan solo un individuo de la localidad de Finca Morocho se encuentra diferente del resto teniendo un coeficiente de endogamia mayor a 0.35, es decir que hay un 35-40% de probabilidad de que este individuo haya atravesado por eventos de endogamia en el

pasado. Debido al valor promedio F bajo presente se puede decir que no han existido eventos de endogamia en los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela. El bajo índice de endogamia es un factor positivo en el presente estudio ya que los altos índices de endogamia en una especie pueden disminuir la diversidad genética así como también reducir el fitness de la población y llegar hasta la extinción de la especie (Husband y Schemske, 1996).

Existen otros índices para corroborar lo mencionado, el estadístico y botánico Wright dividió el coeficiente de endogamia F en dos componentes. Uno de estos es el F_{IT} el cual es el coeficiente de endogamia total ($F_{IT} = -0,079$) y índice F_{IS} el coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones (localidades) ($F_{IS} = -0,007$), ambos valores son extremadamente bajos, por lo que se sugiere que no existe endogamia en los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela.

En el estudio realizado de diversidad genética de *P. guajava* en la isla Isabela por Espín (2018) el coeficiente global de endogamia obtenido fueron diferentes a los resultados del presente estudio. Los valores tanto del coeficiente promedio F , F_{IT} y F_{IS} fueron valores cercanos a uno (promedio $F = 0.7-0.8$, $F_{IT} = 0.62$ y $F_{IS} = 0.63$). Esta evidencia de endogamia que se presenta en los individuos de *P. guajava* analizados en la isla Isabela puede estar relacionado con el tipo de reproducción que tiene la guayaba, y además que ésta tiene la capacidad de auto polinizarse (Sitther *et al.*, 2014), lo que no sucede con los individuos de *P. galapageium* analizados en este estudio. Debido a que la endogamia está altamente relacionada con el tipo de reproducción de la planta (Jiménez y Palafox, 2010), esta deficiencia de endogamia en los individuos de *P. galapageium* analizados puede deberse a ciertos factores reproductivos del guayabillo. Sin embargo, el tipo de reproducción del guayabillo no ha sido muy estudiado por lo que no se puede concluir nada a ciencia cierta. En un estudio realizado por Jiménez y Palafox (2010)

donde analizan a sexualidad de varias especies de plantas, mencionan que el tipo de reproducción de la especie sobre todo si se autopoliniza podrían llevar a una depresión endogámica. Esto sucede cuando los alelos deletéreos (alelos presentes en todos los individuos) se manifestarían en los individuos homocigotos y así disminuiría el fitness de la población.

Cuando dos individuos están genéticamente relacionados es porque compartieron la historia genealógica o tienen ancestros comunes en el pasado reciente. El número de ancestros comunes y sus distancias (es decir, el número de generaciones) de un par de individuos determinan el grado de relación esperado entre los individuos. Los individuos relacionados tienen genotipos más similares en cada locus porque sus alelos tienen una mayor probabilidad de identidad por descendencia que los individuos no relacionados (Wang, 2017). Como resultado, también tienden a tener una mayor similitud en el fenotipo de un rasgo cuantitativo. Se realizó un análisis en el software Coancestry, sobre el nivel de parentesco que presentan los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela, con el objetivo de conocer mucho más a fondo las relaciones que existe entre estos individuos. El software utilizado permite estimar el nivel de parentesco de individuos donde no se conoce muy bien su historia evolutiva (Wang, 2010).

Se obtuvo un nivel de coancestría global cercano a cero (0.0142) lo cual indica que los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela no se encuentran emparentados (Tabla 5). En base a los resultados, se comparó cada valor obtenido de los individuos de las diferentes localidades de estudio y se observó que todos los valores son muy bajos, cercanos a 0. Inclusive algunos valores son negativos, lo cual indica una falta de parentesco entre los individuos (Wang, 2017). Los individuos de la localidad Barrio Loja vs El Mango tuvieron un valor ligeramente alto de parentesco ($r = 0.279$), así como también los individuos de El Mango y El Basurero ($r = 0.146$), a diferencia del resto de

individuos del resto de localidades. Por lo que los individuos de estas localidades podrían estar más emparentados entre si, así como podrían presentar una ligera diferenciación con el resto de individuos. Estos promedios negativos de coancestría también se podría sugerir que la autopolinización en los individuos de *P. galapageium* analizados es baja, sin embargo, no se debería descartar este factor. Se debe tomar en cuenta y hacer un análisis más profundo de los individuos de estas localidades ya que, el aumento en la endogamia puede generar un incremento en la homocigosis, y por ende reducir el fitness de la población (Hernández *et al.*, 2008). La ausencia de endogamia y el bajo nivel de parentesco entre los individuos significan que el fitness de la población se encuentra equilibrado. Y una población más estable y saludable en términos genéticos es beneficioso para la población y su descendencia (Hernández *et al.*, 2008).

8.2. Comparación de la diversidad genética de *P. galapageium* en la isla Isabela y Santa Cruz

8.2.1. Diversidad alélica y genética de *P. galapageium* en las dos islas

Se compararon los estudios de diversidad genética y alélica de los individuos analizados de *P. galapageium* tanto en la isla Isabela como en la de Santa Cruz, donde se obtuvieron los siguientes resultados. El número de alelos obtenidos para los individuos analizados de *P. galapageium* en Isabela fue mayor al número de alelos obtenidos para la misma especie en Santa Cruz (146 y 99 alelos respectivamente). La heterocigosidad esperada los individuos de *P. galapageium* analizados en la isla Isabela fue ligeramente mayor a la heterocigosidad obtenida para los individuos de Santa Cruz ($H_e = 0.732$, $H_e = 0.618$ respectivamente) (Tabla 6).

La diferencia en el número de alelos así como de la heterocigosidad de la misma especie en diferentes islas puede estar explicada porque primero son dos islas diferentes aisladas por una barrera geográfica así como también la misma especie en ambas islas

pudo haber pasado por eventos de adaptación diferentes. Debido a esto, según Maki las poblaciones de las islas pueden ser distintas e incluso la diversidad genética para una especie ubicada en diferentes islas puede variar (2001). Un caso similar sucedió con la especie endémica *Aster miyagii* en las islas Ryukyu, donde se analizó la diversidad genética para esta especie en tres islas y ésta varió en cada una (Maki, 2001).

8.2.2. Diferenciación genética de *P. galapageium* en las dos islas

En cuanto a la diferenciación genética de los individuos de *P. galapageium* analizados tanto en la isla Isabela como en Santa Cruz los valores *Fst* globales obtenidos fueron cercanos a 0 (0.06 y 0.05 respectivamente); lo que se sugiere que en ambas islas existe una leve diferenciación genética. Esta leve diferenciación genética tiene relación con el constante intercambio de genes debido a un apareamiento aleatorio o mediante la dispersión de semillas lo cual es evidente en ambos estudios.

8.2.3. Distribución de la diversidad y estructura poblacional de *P. galapageium* en las dos islas

Se realizó un PCoA para ver si los individuos analizados de *P. galapageium* en ambas islas son de grupos diferentes. En el análisis de coordenadas principales (PCoA) realizado para las dos islas demostró que hay una separación evidente entre los individuos de *P. galapageium* analizados según la isla de procedencia, por lo que se puede sugerir que son dos grupos diferentes. Sin embargo, hay algunos individuos de Santa Cruz que se agruparon junto con los individuos de Isabela (Figura 12). Se recomienda analizar más a fondo los individuos de *P. galapageium* de Santa Cruz que se encuentran agrupados junto con los individuos de la isla Isabela, por lo que podrían estar estrechamente relacionados, o que las dos variedades descritas de *P. galapageium* se encuentren también en Isabela (Jaramillo-Díaz *et al.*, 2017).

Así mismo, se realizó el análisis de estructura poblacional en el software STRUCTURE, con el objetivo de determinar si existe o no estructura. El K óptimo obtenido fue de 3 ($\Delta K = 829.73$), por lo que existe la contribución de tres linajes (Figura 13). Se puede observar en el gráfico que los individuos de Isabela y Santa Cruz pertenecen a grupos diferentes, debido a la marcada separación entre los linajes de color verde y azul. Sin embargo, existe una mayor contribución del linaje color rojo en los individuos de la isla Santa Cruz que en los individuos de Isabela. Esta contribución de dos linajes en la isla Santa Cruz podría estar relacionado con las dos variedades de *P. galapageium* reportadas en Santa Cruz, la variedad *howellii* y la variedad *galapageium* (Porter, 1968). No se ha reportado la presencia de estas dos variedades en el resto de las islas del Archipiélago, sino solamente en Santa Cruz (Jaramillo y Heleno, 2012; McCullen, 1991). También se puede observar unas pequeñas ramificaciones de color azul y rojo en Isabela por lo que podría estar relacionado con guayabillos que migraron hacia Isabela.

8.2.4. Análisis de endogamia de *P. galapageium* en las dos islas

El análisis de endogamia en las dos islas demostró que existe una mayor proporción de individuos se encuentran en un rango de 0.1 a 0.3. Estos valores al ser cercanos a 0 y menores a 0.5 quiere decir que el nivel de endogamia en los individuos analizados de ambas islas es nulo (Figura 14). Sin embargo, existe 6 individuos de Santa Cruz, de la localidad de “Casajo” y “Los Guayabillos”, y 1 de Isabela, de la localidad de Ricardo García que superan el valor de 0.5 de endogamia, por lo que se sugiere realizar un estudio más a fondo en estas localidades. El nivel casi nulo de endogamia corrobora la moderada diversidad genética presente en ambos estudios. Ya que generalmente especies que tienen un valor de endogamia global elevado tienen una diversidad genética baja (Jaén, 1976). El índice de endogamia tiene una correlación con el fitness de la población de una especie (Reed y Frankham, 2003), con este valor se puede tener una

leve idea del estado actual en la que los individuos analizados de *P. galapageium* se encuentran; por lo tanto en base al índice de endogamia y diversidad genética de los individuos analizados en ambas islas esta estable.

8.3. Comparación de la diversidad genética de *P. galapageium* considerando las dos ploidías (2n y 4n)

La poliploidía está muy extendida en el reino vegetal, más de la mitad de las especies de plantas superiores son poliploides (Tate *et al.*, 2005). Varios estudios recientes de plantas poliploides han enfatizado que la formación de poliploides es un proceso que se repite continuamente, a ritmos similares a los de la mutación génica (Soltis y Soltis, 2000; Wendel, 2000). La poliploidía ha sido reconocida durante mucho tiempo como una fuerza prominente que da forma a la evolución de las eucariotas. Sin embargo, los cambios en la expresión génica regulada por ciertos factores epigenéticos a través del tiempo podrían estar implicados en la formación de individuos poliploides (Osborn *et al.*, 2003). Estudios recientes también han proporcionado evidencia de cambios epigenéticos frecuentes en individuos poliploides. Los cambios epigenéticos no implican alteraciones en las secuencias de ADN, pero afectan la expresión génica a través de varias modificaciones interrelacionadas, incluida la metilación del ADN, la modificación de histonas y el empaquetamiento de la cromatina (Chen, 2007; Osborn *et al.*, 2003).

La poliploidía es una característica relativamente descuidada de las especies de plantas y solo se toma en cuenta cuando se analiza su genética de conservación. Una complicación de este tipo de análisis donde se compara la ploidía de una especie es el número de alelos que se obtienen por locus en poblaciones poliploides, que en su mayoría es más alta que en muestras diploides del mismo tamaño (Brown y Young, 2000). En cuanto a la especie en estudio *P. galapageium* no se sabe a ciencia cierta su ploidía; sin embargo, se están realizando análisis genómicos para determinar la ploidía de la especie.

En este estudio se ha visto la presencia de más de dos alelos por locus en varios individuos de *P. galapageium*, específicamente en 5 loci microsatélites analizados, por lo que hay la posibilidad de que sea tetraploide (Anexo 5 y 6). Por esta razón, se realizó el análisis tomando en cuenta la dos ploidías así como la comparación de los índices de diversidad en ambos casos.

En cuanto a la diversidad alélica, el número de alelos obtenidos fue mayor con la ploidía $4n$ (189 alelos) que con la diploidía (146 alelos). Así mismo se obtuvo un mayor número de alelos privados en tetraploide que diploide. En la tetraploidía la localidad que tuvo el mayor número de alelos fue Cerro Grande (121 alelos), mientras que en la diploidía la localidad con el mayor número de alelos fue Barrio Loja (105 alelos). La población con el menor número de alelos en la tetraploidía fue San Joaquín (37 alelos) (Tabla 9), mientras que en la diploidía fue Cerro Grande (34 alelos). En cuanto a la heterocigosidad esperada, este índice fue ligeramente mayor con la diploidía ($H_e = 0,732$) que con la tetraploidía ($H_e = 0.657$). Varios estudios han encontrado que la heterocigosidad y la riqueza alélica (el número de alelos por locus) son más altos en tetraploides en comparación con sus diploides (Brown y Young, 2000; Linhart y Grant, 1996). Sin embargo, en este caso la heterocigosidad con la tetraploidía fue ligeramente menor debido a la presencia de más individuos homocigotos que heterocigotos. Para determinar si esta leve diferencia es significativamente diferente se realizó una prueba t pareada donde el valor p obtenido fue de 0.944 por lo que no existe una diferencia significativa entre las heterocigosidades obtenidas en el análisis diploide y tetraploide.

El valor F_{st} global fue similar en ambos casos, así como los valores pairwise F_{st} , estos valores oscilaban en un rango de 0.001 a 0.08. Las localidades con el valor más alto fue San Joaquín vs El Mango y Cerro Grande vs El Mango en ambas ploidías (Tabla 4 y 10). Debido a que los valores pairwise F_{st} en ambos casos son cercanos a 0, se sugiere

que existe un alto flujo génico y baja diferenciación genética para las dos ploidías. En cuanto a la distribución de la diversidad, así mismo se puede ver que no hay agrupaciones definidas (Figura 8). En el Dendograma Neighbor Joining de ambos análisis las localidades de Barrio Loja y El Mango (localidades ubicadas en la zona de transición) (Figura 5 y 9) son las que tuvieron una longitud de rama mucho más larga que el resto.

En cuanto a la estructura poblacional, el K óptimo en los dos análisis fue distinto, ya que para los individuos diploides el K óptimo fue de tres, es decir que hay una aportación genética de tres linajes. Mientras que para los individuos tetraploides el K óptimo fue de dos, que significa que hay 2 linajes o acervos genéticos que están aportando a los individuos (Figura 6 y 10). Esta diferencia en el número de los acervos genéticos que están aportando a los individuos de *P. galapageium* analizados en Isabela podría estar relacionado con la diversidad obtenida y el número de individuos homocigotos en cada estudio (diploide y tetraploide). En el análisis diploide se obtuvo una heterocigosidad esperada de 0.732 mientras que en el análisis tetraploide 0.657. En el análisis diploide al haber mayor diversidad hay un acervo genético más que en el tetraploide; ya que la diversidad fue 0.1 menor. Cabe mencionar, que para el análisis tetraploide se duplicaron alelos, por lo que eso disminuyó la diversidad debido a la mayoría de individuos homocigotos, a diferencia del análisis diploide donde no se tuvo que duplicar alelos.

Se puede observar en la Figura 10 que las localidades que se encuentran la zona de Transición (El Mango, El Basurero, Ricardo García, Barrio Loja y Finca Morocho) tienen una mayor proporción del linaje rojo. Mientras que los individuos que se encuentran en las localidades de la zona Scalesia (Cerro Grande y San Joaquín) tienen una mayor aportación del linaje color verde (Figura 2). La diferencia de proporción de la contribución de cada linaje puede estar relacionado a las zonas en las que se encuentran los individuos que también está definida por la altitud. Las localidades que se encuentran

en la zona de transición se encuentran alrededor de 100 a 250 msnm donde es una zona seca, hay una menor precipitación mayor radiación solar. Mientras que los individuos de las localidades de la zona Scalesia se encuentran en una zona más húmeda, donde la precipitación es mayor y la radiación solar es menor. Por lo que los individuos *Psidium galapageium* distribuidos en ambas zonas pudieron haber desarrollado características fenotípicas y genotípicas distintas para poder adaptarse de mejor manera a cada zona. Sin embargo, se requiere de análisis más profundos para comprobar la hipótesis planteada.

Finalmente, los resultados obtenidos en el análisis de endogamia hubo una leve diferencia. Ya que hubo una gran cantidad de individuos en la tetraploidía que se encuentran en un rango de 0.3 a 0.5 (Figura 11), lo que no sucede con la diploidía donde la mayor proporción de individuos se encuentra en un rango de 0.05 a 0.2. Esta diferencia en los índices de endogamia podría estar relacionada con el número de homocigotos en la tetraploidía hace que hace que la endogamia infle su valor, lo que no sucede con la diploidía (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

8.3.1. ¿Qué tipo de ploidía se ajusta mejor a los datos obtenidos de diversidad genética en *P. galapageium*?

La poliploidía se define como la presencia de más de dos conjuntos completos de cromosomas en el genoma, que puede en determinadas circunstancias acelerar la adaptación evolutiva al influir en la generación y el mantenimiento de la diversidad genética (Wood *et al.*, 2008). Las comparaciones interespecíficas entre genomas eucariotas pueden identificar eventos de poliploidización antiguos (Clemens *et al.*, 2018). La presencia de individuos de diferente ploidía en una población puede dificultar el apareamiento entre ellos. Por lo tanto, la variación de la ploidía tiende a ocurrir generalmente en organismos que tienen la capacidad de reproducirse asexualmente, son autocompatibles o perennes (Nielsen, 1997).

La poliploidía ha sido reconocida como un fenómeno importante en las plantas vasculares, y este fenómeno está relacionado tanto con el tipo de reproducción de la especie así como de diferentes factores físicos de dispersión. Los factores que influyen en el mantenimiento de dos niveles de ploidía en las especies de plantas son muy poco estudiados. Sin embargo, se atribuye con certeza que la presencia de más de dos ploidías en una misma especie dependerá directamente de la capacidad de mantener a la población viable durante generaciones sucesivas o de colonizar rápidamente nuevas áreas (Petit *et al.*, 2000).

Debido a la presencia de más de dos alelos en la especie en estudio *P. galapageium*, y al no conocer al cien por ciento su ploidía se analizó la posibilidad de una tetraploidía en la especie. Los resultados obtenidos de la prueba LTR realizada rechazaron la hipótesis nula, es decir que se sugiere que los datos obtenidos se ajustan estadísticamente mejor a un modelo diploide que a un modelo tetraploide. Sin embargo, se requiere de la elaboración de un cariotipo, análisis genómicos, citometría de flujo para determinar la ploidía de *P. galapageium*. En un estudio realizado por Gutiérrez *et al* (2005) realizaron determinaciones de la cantidad de ADN y utilizaron la citometría de flujo para determinar la ploidía de *Alnus acuminata*. De igual manera en otro estudio se utilizó la misma técnica (citometría de flujo) para determinar el nivel de ploidía de *Quercus suber*, una especie de elevado interés económico y ecológico (Loureiro, 2009). Los SNPs (polimorfismos de nucleótido simple) y otros marcadores genéticos como los marcadores cromosómicos se utilizan para la identificación individual de una especie, por lo que también se podría realizar un panel de SNPs para identificar de manera precisa la ploidía de *Psidium galapageium*. Los STR o SSR, regiones simples en tándem cortas son altamente informativos debido a la gran cantidad de alelos presentes. A pesar de su alto poder discriminatorio, tienen algunas limitaciones, como los tamaños de amplicones

grandes requeridos, las altas tasas de mutación y la presencia de artefactos, que pueden influir negativamente en el análisis. Para superar estas limitaciones, los SNPs son una técnica mucho más reciente que se podría utilizar para la identificación individual de una especie (Yousefi *et al.*, 2018).

8.4. Importancia de la diversidad genética en la conservación de especies endémicas

Las islas y los archipiélagos a menudo carecen de elementos importantes de la biota que contienen los continentes, y a su vez las especies nativas en los archipiélagos carecen de defensas contra el pastoreo o las depredaciones. Las invasiones biológicas no son el único factor que conduce a tasas de extinción elevadas para las especies insulares. Sin embargo, la tasa de extinción es mucho más alta en las islas porque las especies de las islas generalmente tienen poblaciones pequeñas, una diversidad genética restringida y rangos estrechos antes de la colonización humana. Las introducciones tanto de plantas y animales hacen que sea una de las primeras causas de extinción, poniendo en peligro a las especies endémicas de las islas y de los archipiélagos en general (Wilson, 1988).

Existen varias medidas que deben tomarse en cuenta para reducir los efectos de las invasiones biológicas y proteger parte de la diversidad biológica nativa en islas oceánicas aisladas. (1) Es la identificación de animales y plantas introducidas que puedan amenazar los ecosistemas nativos y enfocarse en la concentración de los esfuerzos de control en esas especies. (2) Selección de áreas de hábitat críticas de las cuales se excluyen la mayoría de las especies introducidas. (3) Protección de áreas de mayor destrucción de hábitat (5) estudios de diversidad genética de especies endémicas, e invasiones biológicas y extinción de especies en la isla para aprender cómo estos mismos procesos pueden afectar a los continentes (Wilson, 1988; Rentería *et al.*, 2007).

Rentería *et al.*, 2007 en conjunto con la Fundación Charles Darwin implementaron estrategias para la erradicación de 21 especies de plantas potencialmente invasoras en las Islas Galápagos. Los planes se encuentran en proceso en diferentes estados de desarrollo y dimensión. Sin embargo, tres proyectos han sido finalizados completamente, trece se encuentran en proceso y cinco no se han iniciado todavía. En planes de erradicación de una especie influyen dos factores: el costo y el tiempo. Estos factores varían dependiendo de la especie que se quiera erradicar, y que en algunos casos la implicación económica es relativamente significativa. Por ejemplo, para la erradicación de la planta invasora *Leucaena leucocephala* en la isla Isabela encontrada en seis sitios de la zona agrícola se requiere de un costo total de \$30.500 para los próximos 15 años (Rentería *et al.*, 2007).

Controlar los efectos de las invasiones biológicas en las islas es primordial, sin embargo; también se puede obtener mucha más información y se puede optimizar los planes existentes de control teniendo conocimiento sobre el efecto de la introducción de especies no endémicas al Archipiélago. Una mejor comprensión de la diversidad genética de especies endémicas, así como las invasiones biológicas y sus consecuencias para la diversidad biológica en las islas contribuirá al desarrollo en todos los niveles de la organización biológica.

El análisis de diversidad genética es importante ya que permite entender de mejor manera cómo las especies endémicas, en este caso *P. galapageium* está respondiendo o interactuando a la convivencia con su especie emparentada invasora *P. guajava*. Debido que en estudios anteriores se ha reportado que *P. guajava* se considera una especie agresiva para *P. galapageium* así como para el resto de especies en la isla (Groves, 2001). A pesar de que existen planes de control de especies introducidas, así como el de conservación de especies endémicas en las Islas Galápagos (Ministerio del Ambiente,

2013), estos planes deben ser regulados y monitoreados para ver que en efecto sean eficientes y se estén cumpliendo.

Tomando en consideración todos los análisis y sugerencias planteadas en el presente estudio se ve necesario realizar estudios acerca de las condiciones ambientales, geografía de las islas, y un inventario detallado de las especies tanto de polinizadores como dispersores de semillas que son los factores que tienen mayor influencia en la diversidad tanto de una especie endémica como introducida. Así como también la concientización a la población que al llevar una especie que no pertenece al lugar de origen puede traer consecuencias drásticas no controlables durante muchos años. Ya que al llevar a una especie sobre todo del continente a las islas no es que solamente va a permanecer ahí por un periodo de tiempo, se erradica y ya; sino que las semillas de la especie introducida pueden permanecer viables en el suelo por más de 10 años luego de remover los árboles semilleros (Walton, 2003).

9. Conclusiones

- La heterocigosidad esperada encontrada en los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela fue moderadamente alta.
- La heterocigosidad esperada de los individuos estudiados de *P. galapageium* en la isla Isabela fue de $H_e = 0.732$, mayor a la heterocigosidad esperada para la misma especie en la isla Santa Cruz $H_e = 0.619$ (Soria, 2018).
- La heterocigosidad de los individuos en estudio de *P. galapageium* en la isla Isabela es mayor que la reportada para *P. guajava* ($H_e = 0.218$) en la misma isla (Espín, 2018).
- En base a los valores F_{st} obtenidos se determinó que existe un alto flujo génico entre los individuos estudiados de *P. galapageium* en la isla Isabela. Se reconoce

cierta diferenciación genética entre los individuos de las localidades de la zona de transición con los individuos de la zona de scalesia.

- En el análisis de coordenadas principales (PCoA) se sugiere que los individuos de la localidad de El Mango se encuentran genéticamente más distantes a los individuos del resto de localidades.
- De acuerdo al análisis en Structure, se reconoce el aporte de tres acervos genéticos en los individuos analizados de *P. galapageium* analizados, pero no se encontró una estructura poblacional definida.
- No hay evidencia de endogamia y parentesco en los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela.
- En el análisis comparativo de la ploidía, la heterocigosidad esperada en diploide ($H_e = 0.732$) fue ligeramente mayor a la analizada en tetraploide ($H_e = 0.657$).
- En el análisis de Structure, en la tetraploidía no hay una estructura poblacional definida, sin embargo, existe la contribución de dos linajes o acervos genéticos para los individuos de *P. galapageium* en la isla Isabela.
- En la prueba de Likelihood Ratio Test (LTR) se determinó que los datos de los individuos analizados de *P. galapageium* se ajustan mejor a una diploidía con un 95% de confiabilidad.

10. Recomendaciones

- En este estudio se analizó la diversidad genética y estructura poblacional de *P. galapageium* tomando en cuenta la diploidía y la tetraploidía. Sin embargo, se recomienda realizar estudios de cariotipo, genómicos y transcripómicos para determinar y confirmar la ploidía de esta especie.
- Para futuros estudios se recomienda tomar datos sobre las condiciones físicas del lugar de muestreo como precipitación, pH, humedad, etc. de cada localidad de

estudio para complementar los análisis realizados. Para tener una idea de las condiciones ambientales en las que los individuos muestreados se desarrollan y ver cómo estas afectan a su crecimiento y diversidad.

- Se recomienda realizar estudios sobre polinización y factores físicos de dispersión de semillas de *P. galapageium* para complementar los análisis realizados.
- Se recomienda realizar estudios de diversidad genética de *P. galapageium* en otras islas del archipiélago de Galápagos, como Floreana, San Cristóbal con el uso de primers específicos para comparar con los resultados obtenidos en estudios anteriores y conocer de una manera más amplia la situación actual de la especie.

11. Bibliografía

- Adelinet, M., Fortin, J., y Ozouville, N. (2007). *The relationship between hydrodynamic Properties and weathering of Soils derived from volcanic rocks, Galapagos Islands, Ecuador*. *Environ Geol* 56:45–58.
- Allendorf, F. (1986). Genetic Drift and the Loss of Alleles Versus Heterozygosity. *Zoo Biology* 5: 181-190
- Archie, J. (1985). Statistical analysis of heterozygosity data: independent simple comparisons. University of Hawaii.
- Barrett, S. (1996). *The reproductive Biology and Genetics of Island Plants*. University of Toronto. Jstor Journal.
- Bensted, S. (2002). *A biodiversity vision for the Galapagos Islands*. Charles Darwin Foundation & World Wildlife Fund, Galapagos, Ecuador
- Blackett, M., Robin, R., Good, R., Lee, S. y Miller, A. (2012). Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments—an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Molecular Ecology Resources* 12: 456-463.
- Blake, S., Wikelski, M., Cabrera, F., Guezou, A., Silva, M., Sadeghayobi, E., Yackulic C., y Jaramillo Patricia. (2012). *Seed dispersal by Galaápagos tortoises*. *Journal of Biogeography*. 39.
- Borges, P., Perdomo, G., y Herrera, E. (2012). *Estructura y diversidad genética en poblaciones manejadas de Chiguire en los llanos venezolanos*. *Revistas Científicas de América Latina*. Obtenido desde <http://www.redalyc.org/html/339/33922725011/>
- Bowman, R. (1966). *The Galapagos: Proceedings of the Symposia of the Galapagos International Scientific Project*. University of California. Obtenido desde https://books.google.es/books?id=f8T3DI5tokYC&dq=genetic+diversity+endemic+plant+species+in+Galapagos&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Brown, A., y Young, A. (2000). *Genetic diversity in tetraploid populations of the endangered Daisy *Rutidosia leptorrhynchoidea* and implications for its conservation*. Centre for Plant Biodiversity Research. Australia.
- Buddenhagen, C., y Jewell, K. (2006). *Invasive plant seed viability after processing by some endemic galapagos birds*. The Neotropical Ornithological Society. 17: 73-80.
- Caballero, A., y García, A. (2013). *Allelic diversity and its implications for the rate of Adaptation*. Universidad Complutense de Madrid, 28080.
- Cárdenas, D., Castaño, N., y Toro, J. (2011). *Plantas introducidas, establecidas e invasoras en Amazonía Colombiana*. Instituto Amazónico de Investigaciones

Científicas-Sinchi. Obtenido desde
<https://www.sinchi.org.co/files/publicaciones/publicaciones/pdf/invasoras%20final%20web.pdf>

- Castoe, T., Poole, A., Koning, J., Jones, K., y Tomback., D. (2012). *Rapid microsatellite identification from Illumina Paired- end Genomic sequencing in two birds and snake*. PloSOne.
- Cimadom, A., Causton, C., Cha, D., Damians, D., Fessl, B., Hood-Nowotny, Lincango, P., Miele, A., Nemeth, E., Semler, E., Teale, A. y Tebbich, S. (2016). *Darwin 's finches treat their feathers with a natural repellent*. Scientific Reports.
- Collins, A., Bush, M., y Sachs, J. (2013). *Microrefugia and species persistence in the Galapagos highlands: a 26.000 year paleoecological perspective*. Florida Institute of Technology, University of Washington. Frontiers in Genetics.
- Charlesworth, D., y Charlesworth, B. (1987). *Inbreeding depression and its evolutionary consequences*. Annual Review of Ecology and Systematics.
- Chen, Z. (2007). *Genetic and epigenetic mechanisms for gene expression and phenotypic variation in plant polyploids*. University of Texas. 58:377-405.
- Clemens, L., Pais, M., Cano, L., Kamoun, S., y Burbano, H. (2018). *nQuire: a statistical framework for ploidy estimation using Next generation sequencing*. BMC Bioinformatics. 19: 122.
- De la Herrán, R., Navajas, R., Molina, M., Ruiz, C., López, M., y Navas, J. (2011). *Análisis comparativo de la variabilidad genética de dos poblaciones de plantas y su implicación en el cultivo*. Universidad de Granada.
- Earl, D., y vonHoldt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno Method. *Conservation Genetic Resources*.
- Eguiarte, L., y Souza, V. (2010). *El flujo génico y estructura de poblaciones*. Genética de Poblaciones. CCG. Obtenido desde <http://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/5flujoFIN2.pdf>
- Ellstrand, N. (1992). *Gene flow by pollen: implications for plant conservation* Genetics. Jstor Journal.
- Ellstrand, N., y Elam, D. (1993). *Population Genetic consequences of small population size: implications for plant conservation*. Annual Review of Ecology and Systematics.
- Espin, A. (2018). *Diversidad genética de la guayaba (Psidium guajava) en la isla Isabela*. Proyecto de Investigación. Universidad San Francisco de Quito.

- Excoffier, L., y H.E, Lischer. (2010). Arlequin suite versión 3.5: A new series of programs to perform population Genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*.
- Frankham, R. (1998). *Inbreeding and Extinction: Island populations*. Key Centre for Biodiversity and bioresources. Macquarie University. Sydney.
- Gherini, J. (2015). *Santa Cruz Island: A history of conflict and diversity*. University of Oklahoma. Pg. 250.
- Godoy, J. (2009). *La genética, los marcadores moleculares y a conservación de especies*. Asociación Española de Ecología Terrestre. Sevilla, España.
- Gordillo, J. (1991). *The Colonization of San Cristobal, Galapagos Islands a historical perspective*. Botanical Research and Management in the Galápagos Islands.
- Griffiths, S.M. (2013). *Isolating microsatellite markers in the marine sponge *Cinachyrella alloclada* for use in community and population genetics studies*. Tesis para el título de MPhil Environmental Biology. University of Manchester.
- Groves, H. (2001). *Weed Risk Assessment*. Csrito Publishing. Obtenido desde https://books.google.es/books?id=sSZcVAavJ0UC&dq=plant+problems+galapagos+islands&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Guézou, A., Trueman, M., Buddenhagen, C., Chamorro, S., Guerrero, A., Pozo, P., y Atkinson, R. (2010). *An extensive Alien Plant Inventory from the Inhabited Areas of Galapagos*. PLoS ONE. Obtenido desde <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0010276>
- Guézou, A., Pozo, P. y Buddenhagen, C. (2007). *Preventing establishment: an inventory of introduced plants in Puerto Villamil, Isabela Island, Galapagos*. Obtenido desde <http://scihub.tw/http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0001042>
- Gutiérrez, L., Gonzaga, L. y Moreno, V. (2005). *Análisis de ploidía por citometría de flujo de callos embriogénicos de *Alus acuminata**. Universidad Tecnológica de Pereira. Colombia. ISSN: 0122-1701.
- Hamann O. (1991). *Indigenous and alien plants in the Galápagos Islands: problems of conservation and development*. In: *Tropical Botanic Gardens: their role in conservation and development*. pp. 169-192. London: Academic Press.
- Hamann, O. (1979). *On Climatic Conditions, Vegetation Types , and Leaf Size in the Galapagos Islands*. Institute of Systematic Botany, University of Copenhagen. Jstor Journal.
- Hernández, J., Mora, J., y Rocha, O. (2008). *Diversidad genética y relaciones de parentesco de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye utilizando marcadores microsatélites*. Revista de biología Tropical. Obtenido desde

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S003477442008000100016&script=sci_arttext&tlng=pt

- Henry, R. (2012). *Molecular Markers in Plants*. John Wiley & Sons. Obtenido desde https://books.google.com.ec/books?id=bBKJ_Fgi3dQC&dq=molecular+marker&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Hosseinzadeh, A., Mohammad, J., Amiri, Z., Mohadjerani, M., y Tafrihi, M. (2016). *Microsatellite (SSR) 78res78ión78tion by PCR usually led to Polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands*. MBRC.NCBI. Obtenido desde <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5219911/pdf/mbrc-5-167.pdf>
- Huber, H., Kane, N., Heschel, M., Von Wettberg, E., Banta, J., Leuck, A., y Schmith, J. (2004). *Frequency and Microenvironmental Pattern of Selection on Plastic shade-avoidance traits in a Natural Population of Impatiens capensis*. Brown University. *The American naturalist*.
- Humme, M. (1993) Galapagos, a Natural History. Canada: University of Calgary in plants. *The plant genome* 1(1):5-20. Obtenido desde https://books.google.com.ec/books?id=TxzU6i_LV0C&pg=PA279&dq=On+Climatic+Conditions,+Vegetation+Types+,+and+Leaf+Size+in+the+Galapagos+Islands&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwj81Z-80a3fAhVNkMMKHWwJDQoQ6AEINjAC#v=onepage&q=On%20Climatic%20Conditions%2C%20Vegetation%20Types%20%2C%20and%20Leaf%20Size%20in%20the%20Galapagos%20Islands&f=false
- Huxel, G. (1999). *Rapid displacement of native species by invasive species: effects of hbridization*. University of California. Biological Conservation. ELSEVIER.
- Husband, B., y Schemske, D. (1996). *Evolution of the magnitude and timing of inbreeding depression in plants*. University of Washington. *Evolution*, 50 (1).
- Iovanna R., Vance C. (2007). *Modeling of continuous-time land cover change using satellite imagery: an application from North Carolina*. *Journal of Land Use Science* 2(3): 147-166
- Ingala, Pronareg y Orstrom. (1989). *Inventario Cartográfico de los recursos naturales, geomorfología, vegetación, hídricos, ecológicos y biofísicos de las Islas Galápagos, Ecuador*. Instituto Nacional Galápagos.
- Itow S. (2003). *Zonation pattern, succession 78res78ió and 78res78ión by aliens in species-poor insular vegetation of the Galápagos Islands*. *Global Environmental Research*, vol. 7(1):39- 58
- Jager, H., Alencastro, M., Kaupenjohann, M., y Kowarik, I. (2013). *Ecosystem chnages in Galápagos highlands by the invasive tree Chinchona bupbescens*. Springer Science.

- Jager, H; Tye A y Kowarik I. (2007). *Tree regeneration in naturally treeless environments: Impacts of quinine (Cinchona pubescens) on native vegetation in Galápagos*. Biological Conservation. Technical University Berlin.
- Jain, S. (1976). *The Evolution of Inbreeding in Plants*. Annual Review of Ecology and Systematics. Jstor.
- Jaramillo-Díaz, P., Guezou, A., Mauchamp, A., y Tye, A. (2017). *CDF Checklist of Galapagos Flowering plants*. Charles Darwin Foundation Galapagos Species Checklist, Puerto Ayora, Galápagos.
- Jaramillo, P., y Heleno, R. (2012). *Guía rápida de semillas de las islas Galápagos*. Charles Darwin Foundation.
- Jaramillo, P., Guézou, A., Mauchamp, A., y Tye, A. (2017). *CDF Checklist of Galapagos flowering plants*. In *Charles Darwin Foundation Galapagos species Checklist*. Puerto Ayora, Galápagos: Charles Darwin Foundation.
- Jakobsson, M., y Rosenberg, N. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population Structure. *Bioinformatics*. (Oxford, England).
- Jewell, C. (2006). . Invasive plant seed viability after processing by some endemic Galapagos birds. *Ornitología Neotropical*.
- Jiménez, C. y Palafox, L. (2010). *Sexuality in plants*. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Johnston, J. (2017). *Why are Invasive Plants Invasive*. Habitat Network. Obtenido desde <http://content.yardmap.org/learn/invasives/>
- Juyó, D. (2012). *Diversidad genética y estructura poblacional en genotipos diploides de papa*. Universidad Nacional de Colombia
- Koressaar, T., y Remm., M. (2007). Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics*.
- Linhart, Y., y Grant, m. (1996). *Evolutionary Significance of Local Genetic Differentiation in Plants*. Annual Review of Ecology Sistematics. Jstor.
- Levin, D. (1975). *Genetic correlates of translocation Heterozygosity in Plants*. University of Texas. Obtenido desde <file:///Users/carolinacazco/Documents/Universidad/heterozigocuty.pdf>
- Legendre, P. y Fortin, J. (2010). *Comparison of the Mantel Test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of Genetic data*. Molecular Ecology Resources.

- Lohse, M., Bolger, AM., Nagel, A., Fernie, AR., Lunn, JE., Stitt, M., Usadel, B., y Robi, NA. (2012). *A user friendly , integrated software solution por RNA-seq –based transcriptomics*. Nucleic Acid Res (40) (Web Server issue), W6227-7.
- Loureiro, J. (2009). *Aplicación de la citometría de flujo en el estudio del genoma vegetal*. Asociación Española de Ecología Terrestre. Ecosistemas 18 (2): 103-108
- López- Caamal, A., Cano, Z., Jiménez, J., Ramírez, R., y Tovar, E. (2014). *Is the insular endemic Psidium socorrense (Myrtaceae) at risk of extinction through hybridization?*. Plant Systematics Evolution. Springer.
- MacArthur, R., y Wilson, E. (1967). *The Teory of Island Biogeography*. Princeton University Press. Princeton. Convention on Biological Diversity. Obtenido desde [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=a10cdkywhVgC&oi=fnd&pg=PR7&dq=MacArthur,+R.,+y+Wilson,+E.+\(1967\).+The+Theory+of+Island+Biogeography.&ots=Rh7_uGVhED&sig=Mla7n3YtLGohOORDAwSWwvUmcSM#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=a10cdkywhVgC&oi=fnd&pg=PR7&dq=MacArthur,+R.,+y+Wilson,+E.+(1967).+The+Theory+of+Island+Biogeography.&ots=Rh7_uGVhED&sig=Mla7n3YtLGohOORDAwSWwvUmcSM#v=onepage&q&f=false)
- Magurran, A. (2013). *Measuring Biological Diversity*. John Wiley & Sons. Obtenido desde https://books.google.com.ec/books?id=fIjsaxmL_S8C&dq=definition+of+biological+diversity&lr=&hl=es&source=gbs_navlinks_s
- Maki, M. (2001). *Genetic differentiation withing and among Island Populations of the Endangered Plant Aster miyagii*. American Journal of Botany.
- Masuelli, R. (1999). *Uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genéticos de especies hortícolas*. Avances en horticultura.
- Meirmans, P. (2006). *Using the AMOVA framework to estimate a standarized Genetic differentiation measure*. Evolution 60 (11). Canadá.
- Ministerio del Ambiente. (2013). *Parque Nacional Galápagos*. Recuperado el 15 de Agosto de <http://www.ambiente.gob.ec/parque-nacional-galapagos/#>
- Moreira, M. (2003). *A conditional Likelihood Ratio test for structural models*. The Econometric Society. Jstor Journal.
- McCullen, C. (1991). *Flowering plants on the Galapagos*. Cornell University. Obtenido desde <http://www.cornellpress.cornell.edu/book/?GCOI=80140105968460>
- Nei, M. (1978). *Estimation of average heterocigosity and Genetic distance from a small number of individuals*. Genetics.
- Nielsen, R. (1997). *A likelihood approach of population samples of microsatellite alleles*. Department of Integrative Biology. University of California.
- Ortega, J., Santos, A., Chul, S., y Crawford, D. (2015). *Plant Genetic Diversity in the Canary Islands: a conservation perspective*. American Journal of Botany.

- Osborn, T., Pires, J., Birchler, J., Auger, D., Chen, Z., Se-Lee, H., Comai, L., Madlung, A., Doerge, R., Colot, V., y Martienssen, R. (2003). *Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids*. NHI Public Access. Trends Genet 19 (3): 141-147.
- Petit, C., Bretagnolle, F., y Felber, F. (2000). *Evolutionary consequences of diploid-polyploid hybrid zones in wild species*. Trends in Ecology and Evolution.
- Porter, D. (1968). *Psidium (Myrtaceae) in the Galapagos Islands*. Missouri Botanical Garden. Doi: 10.2307/2395130
- Pritchard, J. (2004). *STRUCTURE. (Version 2.3.4)*. Standford University.
- Randell, R., Howarth, D., y Morden, C. (2014). *Genetic analysis of natural hybrids between endemic and alien *Runus (Rosaceae)* species in Hawaii*. Univeristy of Hawaii. Conservation Genetics.
- Reaser, J. (2007). *Ecological and socioeconomic impacts of invasive alien species in island ecosystems*. University of Rhode Island. Natural Resources
- Reed, D., y Frankham, R. (2003). *Correlation between Fitness and Genetic diversity*. Conservation Biology. Jstor.
- Rentería, J., Atkinson, R., y Buddenhagen, C. (2007). *Estrategias para la erradicación de 21 especies de plantas potencialmente invasoras en Galápagos*. Fundación Charles Darwin.
- Rentería, J., Gardener, M., Panetta, F., Atkinson, R., Crawley, M. (2007). *Possible impacts of the invasive plant *Rubus niveus* on the native vegetation of the scale Forest in the Galapagos Islands*. PloSOne.
- Rimieri, P. (2017). *Genetic diversity and genetic variability: two different concepts associated to plant germplasm and Breeding*. Journal of basic and Applied Genetics. Argentina. Obtenido desde http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1852-62332017000300001
- Ríos, E., Mejía, H., y Ticul, S. (2009). *Marcadores moleculares una revolución en la zoología*. Revista Ciencia. Obtenido desde http://www.revistaciencia.amc.edu.mx/images/revista/60_3/PDF/01-496-Marcadores-moleculares.pdf
- Rosenberg, N. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population Structure. Molecular Ecology Notes.
- RStudio Team. (2015). *RStudio Integrated development for R. (Version 3.4.2)*. Software. RStudio, Inc. Obtenido el 9 de junio 2018 de <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>.

- Saghai-Marooif, M., Soliman, K., Jorgensen, R., y Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(24), 8014–8018.
- Sax, D., Gaines, S., y Brown, J. (2002). *Species invasions exceed extinctions on Islands Worldwide: a comparative study of plants and birds*. The American Naturalist. University of New Mexico.
- Sitther, V., Zhang, D., Harris, D., Yadav, A., Zee, F., Meinhardt, L., y Dhekney, S. (2014). *Genetic characterization of guava (Psidium guajava) germplasm in the United States using microsatellite markers*. Springer Science.
- Soria, A. (2018). *Estandarización de Primers específicos y Análisis de diversidad genética de Psidium galapageium en la isla Santa Cruz, Galápagos*. Universidad San Francisco de Quito.
- Soltis, D., y Soltis, P. (2000). *Polyploidy: recurrent formation and genome evolution*. REVIEWS.
- Schofield, E. (1989). *Effects of Introduced plants and Animals on Islands Vegetation: Examples from the Galapagos Archipiélago*. Kansas State University. USA.
- SoftGenetics. LLC. (2012). *Software gene marker*. ® [Software]
- Slatkin, M. (1985). *Gene flow in natural populations*. Annual Review of Ecology and Systematics. Jstor Journal.
- Scientific. (sf). *3130 Genetic Analyzer (factory refurbished)*. Thermo Fisher Scientific. Obtenido el 20 de Julio de 2018 desde <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/313001R>
- Schneider, S., Laval, G., Excoffier, L. (2000). *Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics analysis*. EvolBioInform.
- Stoops, G. (2013). *A micromorphological evaluation of pedogenesis on Isla Santa Cruz (Galápagos)*. Spanish Journal of Soil Science. 281, S8. B9000.
- Stuessy, T., Takayama, K., López-Sepúlveda, P., y Crawford, J. (2014). *Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands*. Botanical Journal of the Linnean Society
- Szpiech, Z., y Rosenberg, N. (2014). *On the size distribution of private microsatellites alleles*. University of Michigan. ELSEVIER.
- Tate, J., Soltis, D. y Soltis, P. (2005). *Polyploidy in plants*. Capítulo 7. The Evolution of Genome. Science Direct.

- TermoFisher. (2018). 3130. Genetic Analyzer (Factory refurbished). Applied Biosystems. Recuperado el 10 de Noviembre de 2018 desde <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/313001R>
- Torres, M.L., y Gutierrez, B. (2018). *A preliminary assessment of the Genetic Diversity and Population Structure of Guava, Psidium guajava, in San Cristóbal*
- Tye, A. (2001). *Invasive plant problems and requirements for weed risk assessment in the Galapagos Islands*. En Groves, R., H., Panetta, F., y Virtue, J., *Weed Risk assessment*. Melbourne. Australia.
- Tye, A. (2006). *Can we infer island introduction and naturalization rates from inventory data*. Evidence from introduced plants in Galapagos. Obtenido desde <https://link.springer.com/article/10.1007/s10530-004-3574-2>
- Tye, A., Atkinson, R., y Carrión, V. (2007). *Increase in the number of introduced plant species in Galapagos*. Charles Darwin Foundation. Galapagos National Park.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., y Rozen., S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.*
- UOD. (2017). *Types of molecular markers*. Institute of Lifelong Learning. University of Delhi. Obtenido desde <http://vle.du.ac.in/mod/book/view.php?id=11564&chapterid=22175>
- Uribe, C. (2014). *Diversidad genética de Mytilus chilensis utilizando marcadores microsatélites*. Universidad de Chile.
- Valle, G., Zucchi, M., Stabellini, N., Lourencao, A., Pinheiro, J. (2011). *Estructura Genética Poblacional de Bemisia tabaco (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) utilizando marcadores microsatélites*. Instituto Agronómico de Campinas, Brasil. ISSN: 1519-566X
- Velázquez, M., Samaniego, J., Severino, E., Sáenz, R., Solano, A., Eraso, D., Proaño, D., Campos, E., Mendoza, S., Rousseaud, A., Zambrano, C., Ramírez, A., y García, M. (2012). *Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2012-2016*. Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Isabela.
- Walsh, S., McClearly, A., Mena, C., Shao, Y., Tuttle, J., González, A., y Atkinson, R. (2007). *QuickBird and Hyperion data analysis of an invasive plant species in the Galapagos Islands of Ecuador: Implications for control and land use mangement*. University of North Carolina. Science Direct. Elsevier.
- Walton, C. (2003). *Pest Status Review Series-Land Protection, Leucaena leucocephala*. Natural Resources.
- Wang, J. (2010). *COANCESTRY: a program for simulating, estimating, and analysing relatedness and inbreeding coefficients*. Zoological Society of London. Molecular Ecology Resources.

- Wang, J. (2017). *Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals*. Revista Nature. Obtenido desde <https://www.nature.com/articles/hdy201752>
- Wendel, J. (2000). *Genome evolution in polyploids*. Iowa State University. Plant molecular Biology 42: 225-249.
- Wen, W. (2002). *Admixture model*. Stanford University. Obtenido el 10 de diciembre de 2018 desde <https://web.stanford.edu/group/pritchardlab/software/readme/node16.html>
- Wilson, E. (1988). *Biodiversity*. National Academies Press. Harvard University. Obtenido desde https://books.google.es/books?id=qACfAwAAQBAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Winner, L. (2017). *Statistical Regression Analysis*. Department of Statistics. University of Florida.
- Wiggins, I., Porter, D., y Anderson, E. (1971). *Flora of the Galapagos Islands*. Stanford University Press. Pág. 3-22. Obtenido desde https://books.google.com.ec/books?id=8mh056R6IGsC&printsec=frontcover&q=Flora+of+the+Galapagos+Islands.&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi-5_uA1a3fAhVmS98KHeDfBU5Q6AEIKzAA#v=onepage&q=Flora%20of%20the%20Galapagos%20Islands.&f=false
- Wolf, D., Naoki, T., y Loren, H. (2014). *Predicting the risk of extinction through Hybridization*. Wiley Society for Conservation Biology.
- Wood, T., Naoki, T., Michael, B., Itay, M., Greenspoon, P., y Rieseberg, L. (2008). *The frequency of polyploid speciation in vascular plants*. Institute for Evolution and Biodiversity. University of Munster.
- Wright, S. (1978). *Evolution and the Genetics of populations, Variability within and among natural populations*. University of Chicago. Obtenido desde [https://www.scirp.org/\(S\(oyulxb452alnt1aej1nfow45\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1966008](https://www.scirp.org/(S(oyulxb452alnt1aej1nfow45))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1966008)
- Yousefi, S., Abbassi, T., Kraaijenbrink, T., Vermaat, M., Mei, H., Vant 't Hof, P., van Iterson, M., Zhernakova, D., Claringbould, A., Franke, L., Hart, L., Slieker, R., van der Heijden, A., Knijff, p., Bios Consortium y Hoen, P. (2018). *A SNP panel for identification of a DNA and RNA specimens*. BMC genomics.

12. Tablas

Tabla 1.- Marcadores microsatélites SSR utilizados en el estudio, secuencias *Forward* y *Reverse*, el fluoróforo utilizado para cada uno de los primers, la temperatura con la que se amplificó exitosamente. También, se indica el número de alelos obtenidos en cada locus analizado y el rango de los tamaños de los alelos encontrados en pares de bases (pb).

Primer	Secuencias Forward y Reverse	Fluoróforo	Temperatura de Annealing estandarizada	Nº de alelos	Expected Size
GYB3	F: GCCTCCCTCGCGCCAAAAAGTCAAATAAAGCCGCCTACG	6FAM	65°C	14	200-300
	R: AGGTTACTCTAATGCCCTTTCGG				
GYB4	F: GCCTCCCTCGCGCCAGTAGGCTTTGAAAATTCTCATCCG	VIC	65°C	14	300-400
	R: CTTATGGAGGCAAATTCGATCAGG				
GYB5	F: GCCTCCCTCGCGCCACACAAGTATCGTGCTACCAAATCG	NED	64°C	3	300-400
	R: GGCGGATATGCAAATATATGATCG				
GYB6	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCTACCTAAGTGTGGAAAGAGAACG	VIC	63°C	12	300-400
	R: GGAAACCACTCGTGAGTATTACAGC				
GYB7	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCAGGCAAGAACAGATAGAGATCG	PET	65°C	9	300-400
	R: TCTTCTCAACAACCAGATTCTCACC				
GYB8	F: GCCTCCCTCGCGCCAATGGCCGGAAGAATCAAATCC	6FAM	65°C	12	300-400
	R: CATCTCTCATCTTGTTCACATCC				
GYB9	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCTCTGTTAATCTGGGCTTTGC	VIC	62°C	7	200-300
	R: CTCCTTCACAAAATTCACACTGACC				
GYB14	F: GCCTCCCTCGCGCCAATCCACTTTCATATCATGCAAGACC	NED	65°C	9	300-400
	R: TGCACAAATGTATCCTCTTAACTGC				
GYB18	F: GCCTCCCTCGCGCCAACTGAGTTTCGATCGAGTCTATGGG	PET	57°C	17	300-400
	R: AGAGCCCTAAGGACTTAGAGAATGC				
GYB21	F: GCCTCCCTCGCGCCACCGATTTCTGGTAAGGAGAGAGG	PET	57°C	7	200-300
	R: TGTTGTAGTTTGTAGGTCCATGTCCG				
GYB22	F: GCCTCCCTCGCGCCAATGAAGATCAACCTCTCCATTGC	VIC	57°C	13	200-300
	R: AGTAATGACTCCGGTCAGTCTCC				

GYB23	F: GCCTCCCTCGCGCCACTTAAATTTTCCGCTCTCTCTCTCG	6FAM	65°C	8	300-400
	R: ACAAATCCACGGTAATTGTATGAGC				
GYB25	F: GCCTCCCTCGCGCCAGCCAGCAAATCAAATTATCCC	6FAM	54°C	8	300-400
	R: GGACCGATCAAATCTTCTAAACC				
GYB27	F: GCCTCCCTCGCGCCATCTTGATGAACCAAGACCTACTGC	NED	65°C	21	300-400
	R: CCAAACACAAGATAACGAACCTTCC				
GYB29	F: GCCTCCCTCGCGCCATTTGTCGGGACTCTCTAATGGC	PET	63	10	300-400
	R: GAGGTTACGTAGAATTCTTGATGTGC				

(Los mismos marcadores microsatélites SSR se utilizaron para los análisis diploides y tetraploide) (Blackett *et al.*, 2012; Griffiths, 2013)

Análisis Diploide

Tabla 2.- Individuos que presentaron más de dos alelos por locus con los siguientes marcadores microsatélites SSR.

Primer	Individuos	Primer	Individuos
GYB4	YBL2 R	GYB25	YSJ5
GYB6	YFM11		YSJ20
GYB14	YRG13		YFM6
	YRG12		YFM7
	YSJ13		YCG7
	YBA2		YMA2
	YCG19		YMA4
GYB9	YSJ15		YRG1
	YSJ16		YRG2
	YSJ17		YBL1R
	YSJ18		YCG14
	YSJ19		YCG2
	YFM5		YCG8
	YFM10		YFM1
	YFM12		YFM2
	YFM13		YRG10
	YFM14		YFM19
	YFM15		YFM3
	YFM18		YSJ14
	YFM20		YBA3
	YMA 1		YCG5
	YMA 3		YMA6
	YMA 5		YCG1
	YCG2		YFM8

	YCG 3		YCG5
	YCG 12		YFM8

Tabla 3.- Indicadores de diversidad genética para las 7 localidades de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Para cada localidad se indica el número de individuos analizados, el número de alelos, el número de alelos privados, la heterocigosidad observada y esperada

Población	Nº de individuos	Nº de alelos	He	Ho	Alelos privados
Ricardo García	13	65	0,69	0,74	8
San Joaquín	18	83	0,74	0,77	23
El basurero	8	86	0,65	0,74	5
Finca Morocho	20	44	0,67	0,71	8
El Mango	6	81	0,54	0,79	1
Barrio Loja	2	105	0,46	0,73	2
Cerro Grande	19	34	0,70	0,76	15

Tabla 4.- Valores *Pairwise* F_{ST} para todas las localidades en estudio de *P.galapageium* de la Isla Isabela

	Ricardo García	San Joaquín	El basurero	Finca Morocho	El Mango	Barrio Loja	Cerro Grande
Ricardo García	0,000						
San Joaquín	0,0483	0,000					
El basurero	0,0370	0,0647*	0,000				
Finca Morocho	0,0413	0,0377	0,0491	0,000			
El Mango	0,0658	0,0795*	0,0322	0,0434	0,000		
Barrio Loja	0,0470	0,0621*	0,0509	0,0454	0,0393	0,000	
Cerro Grande	0,0580	0,0359	0,0676*	0,0528	0,0739*	0,0447	0,000

Valores entre 0 y 0,05 = baja diferenciación genética. Valores entre 0,05 y 0,15 = moderada diferenciación genética. Valores entre 0,15 y 0,25 = alta diferenciación genética (Wright, 1978).

Tabla 5.- Coeficientes de Coancestry obtenidos mediante el método de Wang para los individuos analizados de *P.galapageium* de la Isla Isabela.

Localidades	Ricardo García	San Joaquín	El basurero	Finca Morocho	El Mango	Barrio Loja	Cerro Grande
Ricardo García	0,0685						
San Joaquín	-0,7104	0,0230					
El basurero	0,0596	-0,0360	0,1400				
Finca Morocho	-0,0169	-0,0156	0,0130	0,1070			
El Mango	0,1393	0,0100	0,1460	0,1570	0,5240		
Barrio Loja	0,1147	-0,1120	0,1620	0,0360	0,2790	0,5870	
Cerro Grande	-0,0619	-0,0940	-0,4000	0,0390	0,0730	-0,0008	0,1020
Valor de coancestría promedio: 0,01420							

Tabla 6.- Indicadores de diversidad genética para las poblaciones analizadas de *P.galapageium* de las Islas Isabela y Santa Cruz. Para cada isla se indica el número de individuos muestreados, el número de alelos obtenidos en total, el número de alelos privados, y la heterocigosidad esperada y observada

Isla	Nº de individuos	Nº de alelos	He	Ho	Alelos privados
Isabela	86	146	0,732	0,748	62
Santa Cruz	87	99	0,618	0,560	28

Tabla 7.- Número de alelos compartidos y no compartidos en las poblaciones de *P. galapageium* analizados en la Isla Isabela y Santa Cruz (Soria, 2018).

Primer	Nº de alelos compartidos entre Isabela y Santa Cruz	Nº de alelos no compartidos entre Isabela y Santa Cruz
GYB3	5	9
GYB4	2	12
GYB5	3	3
GYB6	5	7
GYB7	4	5
GYB8	5	4
GYB9	3	4
GYB14	5	4
GYB18	8	9
GYB21	3	4
GYB 22	5	8
GYB23	4	4
GYB25	1	7
GYB27	7	14
GYB29	5	5

Tabla 8.- Valores *Pairwise* F_{ST} para todas las localidades en estudio de *P.galapageium* de la Isla Isabela comparados con la isla Santa Cruz.

Localidad	Isabela	Santa Cruz
Isabela	0.0000	0.0875
Santa Cruz	0.0875	0.0000

Análisis Tetraploide

Tabla 9.- Indicadores de diversidad genética para las 7 localidades de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Para cada localidad se indica el número de individuos analizados, el número de alelos, el número de alelos privados, la heterocigosidad esperada.

Población	Nº de individuos	Nº de alelos	Alelos privados	He
Ricardo García	13	74	11	0,715
San Joaquín	18	37	31	0,758
El basurero	8	93	6	0,675
Finca Morocho	20	96	11	0,686
El Mango	6	49	2	0,574
Barrio Loja	2	95	2	0,481
Cerro Grande	19	121	19	0,716

Tabla 10.- Valores *Pairwise* F_{ST} para todas las localidades en estudio de *P.galapageium* de la Isla Isabela.

Localidades	Ricardo García	San Joaquín	El basurero	Finca Morocho	El Mango	Barrio Loja	Cerro Grande
Ricardo García	0,000						
San Joaquín	0,0447	0,000					
El basurero	0,0479	0,0740*	0,000				
Finca Morocho	0,0429	0,0483	0,0490	0,000			
El Mango	0,0603	0,0885*	0,0538	0,0523	0,000		
Barrio Loja	0,0409	0,0577	0,0532	0,0329	0,069	0,000	
Cerro Grande	0,0409	0,0321	0,0684*	0,0481	0,0860*	0,0454	0,000

Valores entre 0 y 0,05 = baja diferenciación genética. Valores entre 0,05 y 0,15 = moderada diferenciación genética. Valores entre 0,15 y 0,25 = alta diferenciación genética (Wright, 1978).

13. Figuras



Figura 1.- Árbol de *Psidium galapageium* en la isla Isabela, de la localidad de Cerro Grande (tomada por María José Pozo y Juan Delgado 2016).

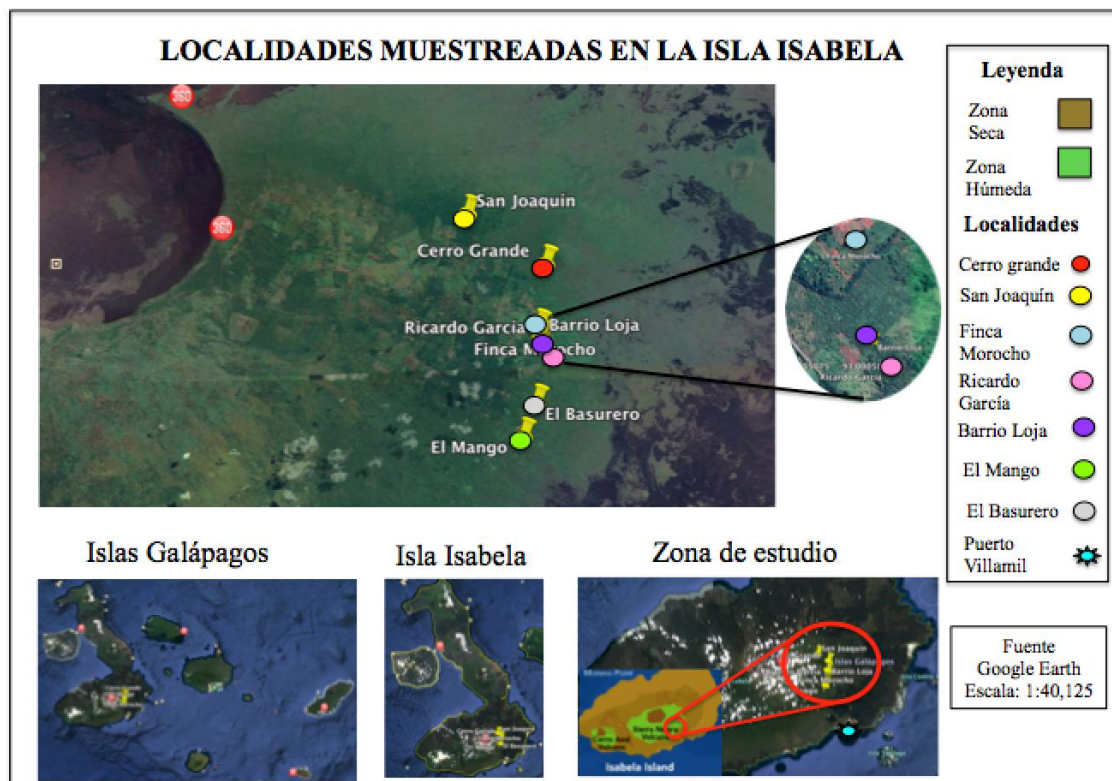


Figura 2.- Mapa del área de estudio donde se indica la localización de los individuos de *P. galapageium* muestreados.



Figura 3.- Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% del ADN de los productos amplificados de los marcadores microsatélites GYB27 y GYB8 de 10 individuos de *P.galapageium* analizados en la isla Isabela (RG: Ricardo García, SJ: San Joaquín, BA: El Basurero, L: ladder de 100 pb (Invitrogen), C-: control negativo).

Análisis Diploide

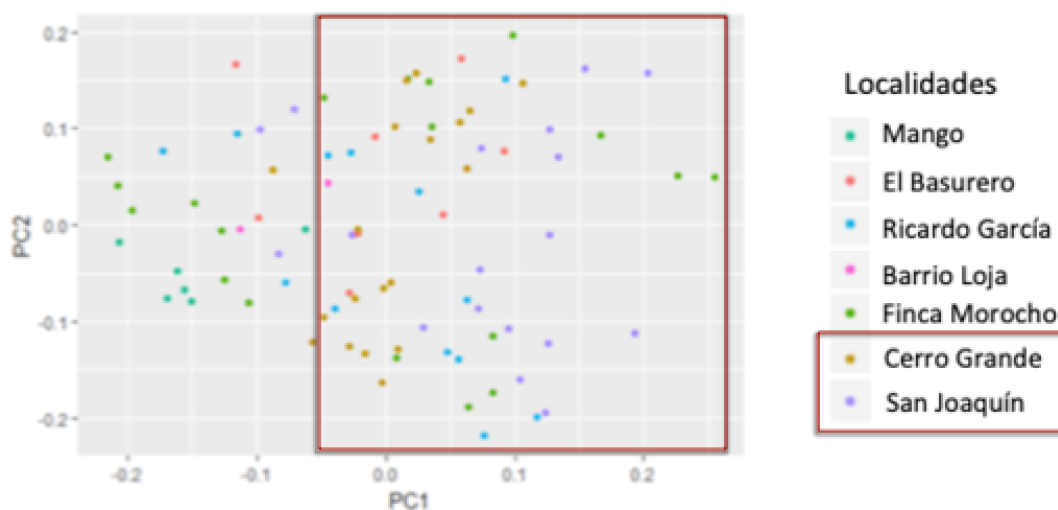


Figura 4.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela Cada color de punto representa cada una de las 7 localidades. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos (sin considerar necesariamente su procedencia) representados con circunferencias de colores verde, azul y rojo.

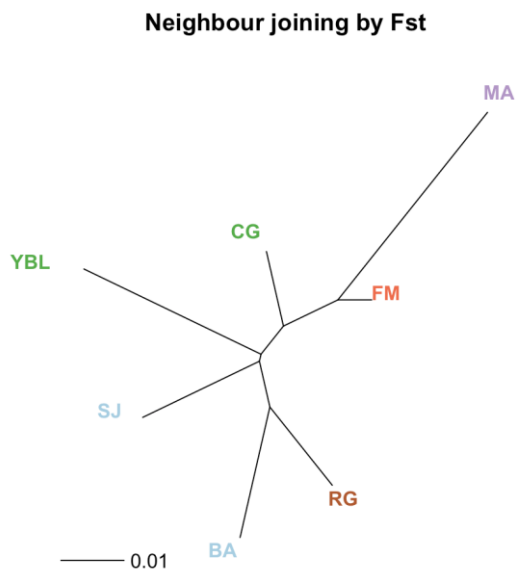


Figura 5.- Dendrograma Neighbor Joining (NJ) por las localidades analizadas de los individuos de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Las longitudes de las ramas representan las distancias genéticas entre las localidades.

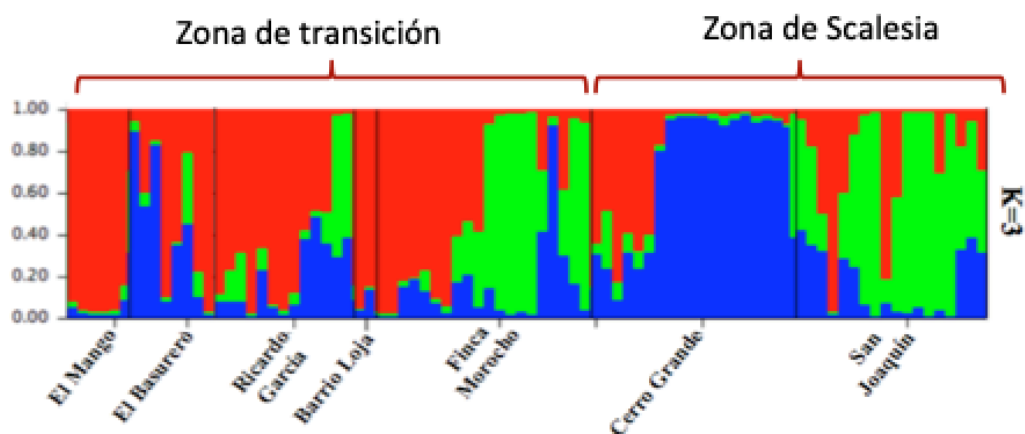


Figura 6.- Resultado de estructura poblacional considerando los 86 individuos muestreados en Isabela en las 7 localidades con un valor óptimo de $K=3$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde, azul y rojo). Los individuos de las localidades de El Mango, El Basurero, Ricardo García, Barrio Loja y Finca Morocho se encuentran a una altitud de 100 a 220 msnm ubicados en la zona de transición. Los individuos de la localidad de Cerro Grande y San Joaquín se encuentran en una altitud de 220 a 400 msnm ubicados en la zona Scalesia.

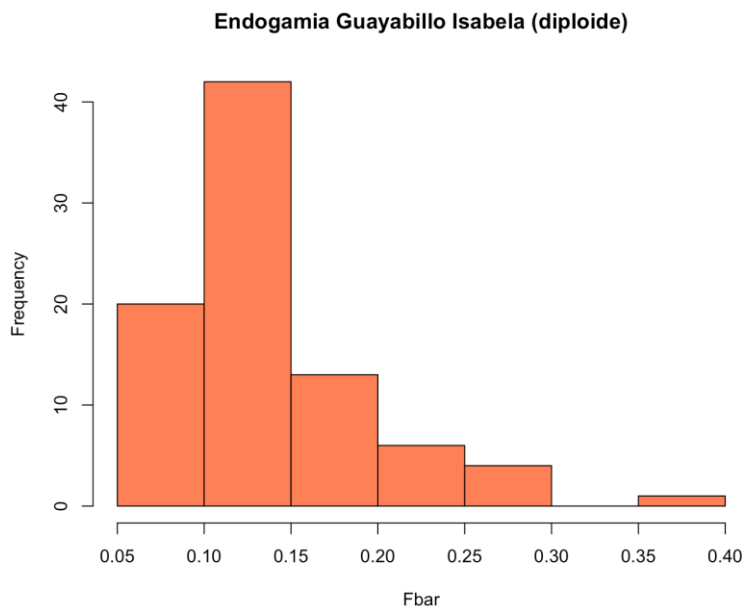


Figura 7.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 86 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.05-0.30), lo cual indica que no hay endogamia en la población.

Análisis Tetraploide

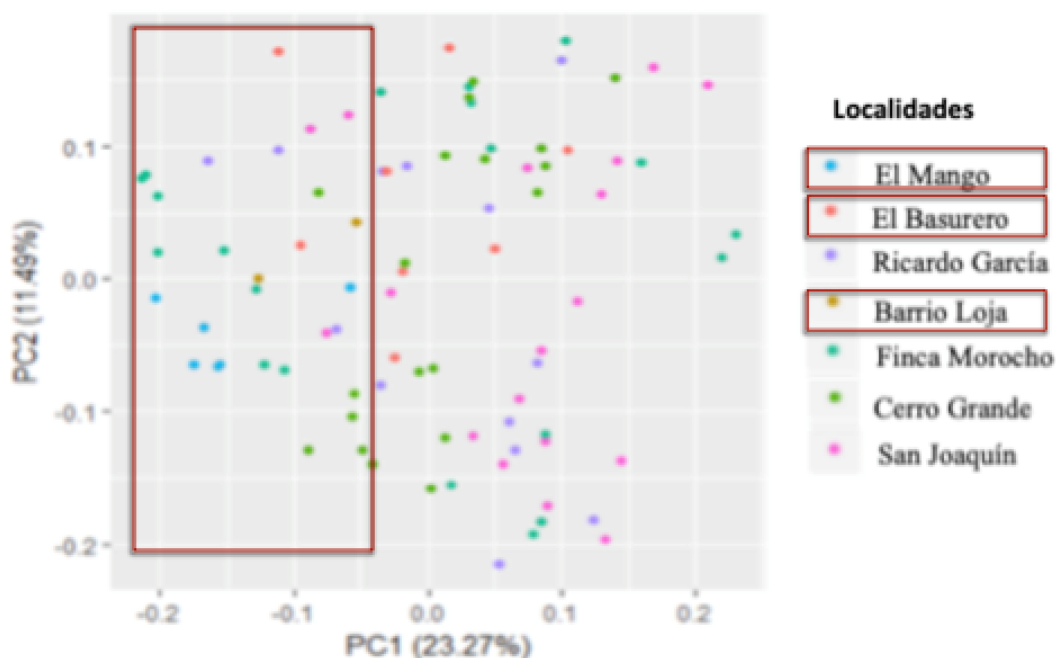


Figura 8.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela. Cada color de punto representa cada una de las 7 localidades. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en tres grupos (sin considerar necesariamente su procedencia) representados con circunferencias de colores verde, azul y rojo.

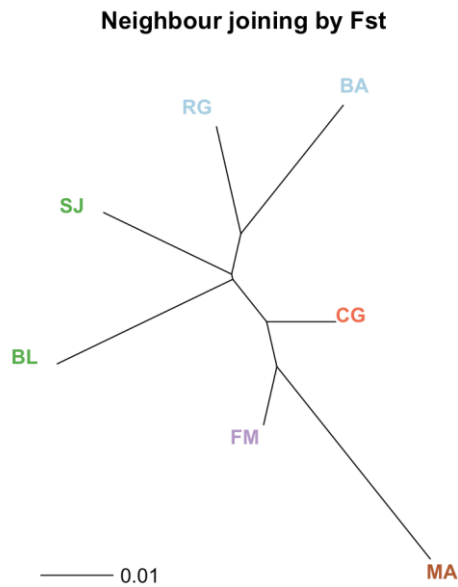


Figura 9.- Dendrograma Neighbor Joining (NJ) por las localidades analizadas de los individuos de *P.galapageium* en la Isla Isabela. Las longitudes de las ramas representan las distancias genéticas de las localidades.

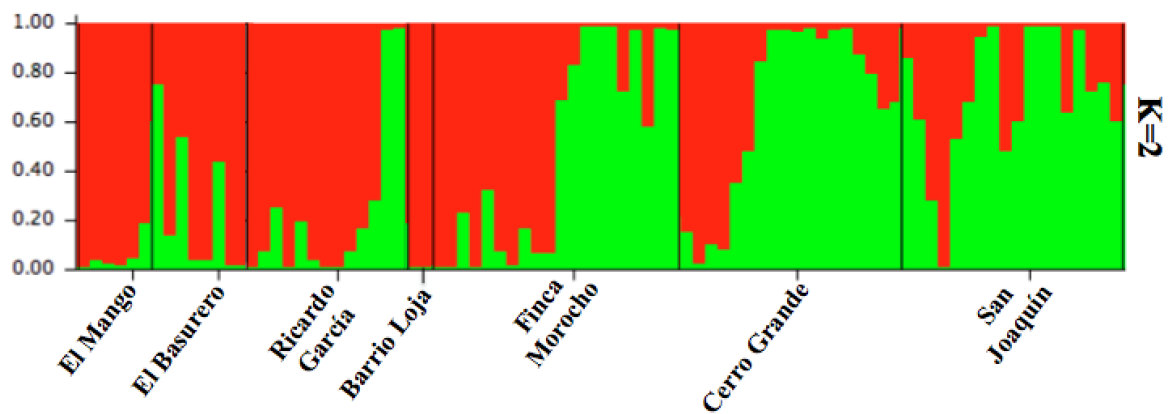


Figura 10.- Resultado de estructura poblacional considerando los 86 individuos muestreados en Isabela en las 7 localidades con un valor óptimo de $K=2$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde y rojo).

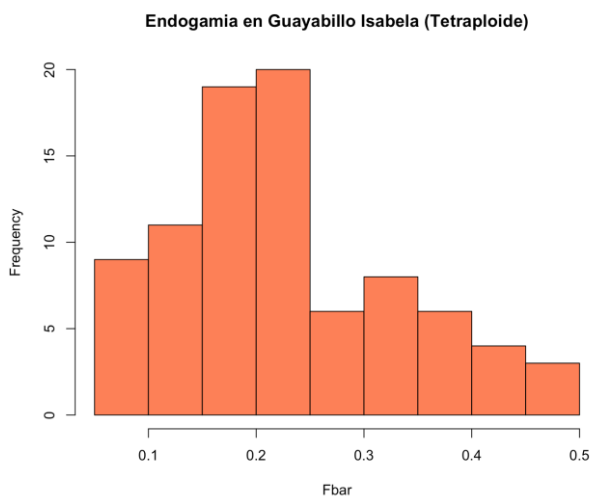


Figura 11.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 86 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.1-0.50), lo cual indica que no hay endogamia en la población.

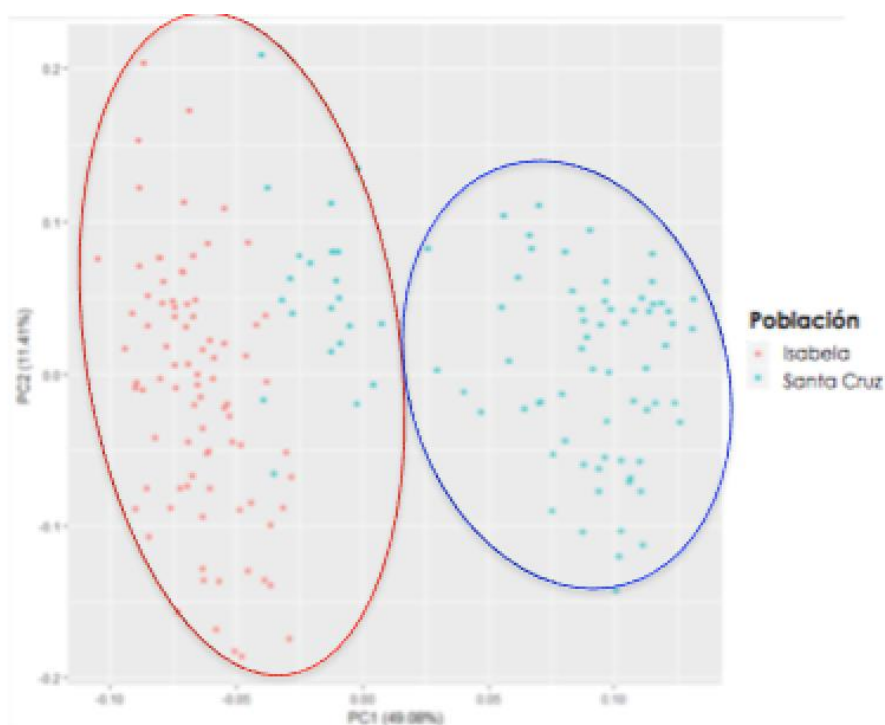


Figura 12.- PCoA de los individuos analizados de *P. galapageium* en la isla Isabela y en la isla Santa Cruz (Soria, 2018). Los dos colores representan los individuos de cada isla. Se sugiere que los individuos muestreados se agrupan en dos grupos dependiendo de su lugar de procedencia representados con circunferencias de color azul y rojo. Se debe analizar los individuos de color celeste (Santa Cruz) que forman parte del grupo que engloba a los individuos de Isabela.

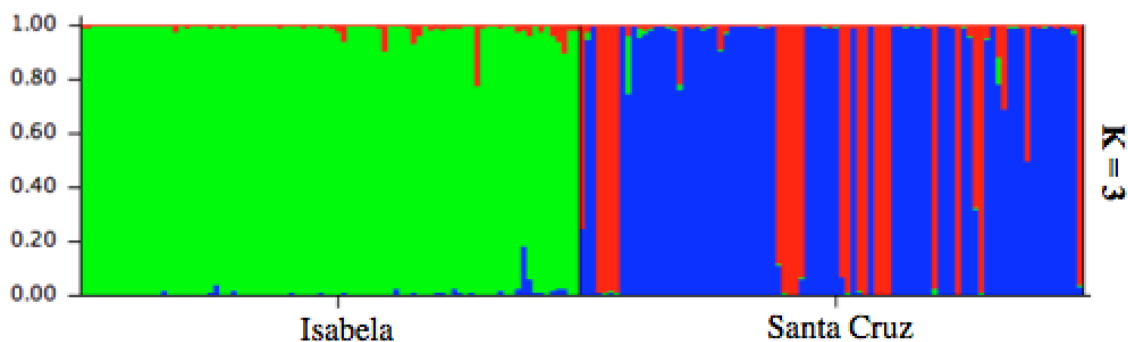


Figura 13.- Resultado de estructura poblacional considerando los 173 individuos muestreados en Isabela (86 individuos) y en Santa Cruz (87 individuos) con un valor óptimo de $K=3$. Los valores de K corresponden al número de acervos genéticos representados con diferentes colores (verde, azul y rojo).

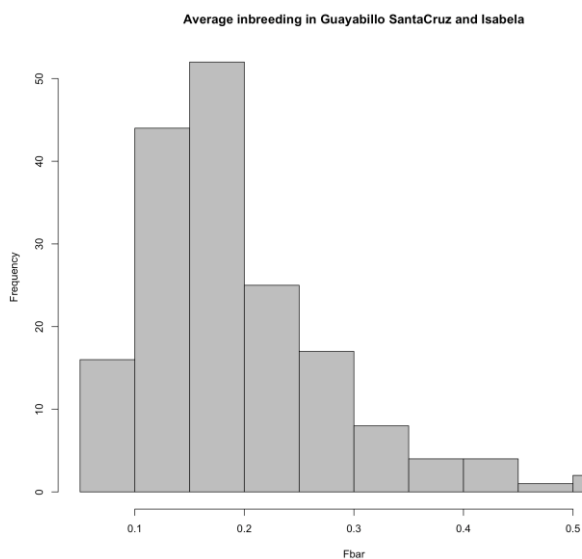
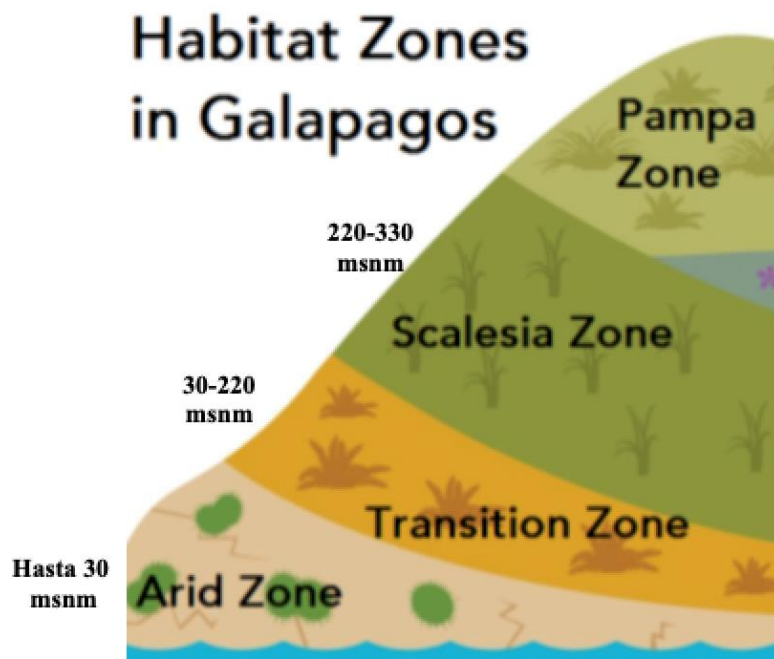


Figura 14.- Frecuencia de los coeficientes de endogamia F observados en los 173 individuos analizados de *P.galapageium* en Isabela y Santa Cruz, Galápagos. La mayoría de los individuos se encuentran en valores F promedio cercanos a 0 (Valor F promedio 0.1-0.40), lo cual indica que no hay endogamia en la población.

14. Anexos



(Fuente: Wiggins, Porter, y Anderson, 1971)

Anexo 1.- Microambientes característicos en las Islas Galápagos.

$$X_{LR}^2 = [\log(\theta_0) - \log(\theta_1)]$$

$$X_{LR}^2 = [325.0 - 206.4]$$

$$X_{LR}^2 = 237.2$$

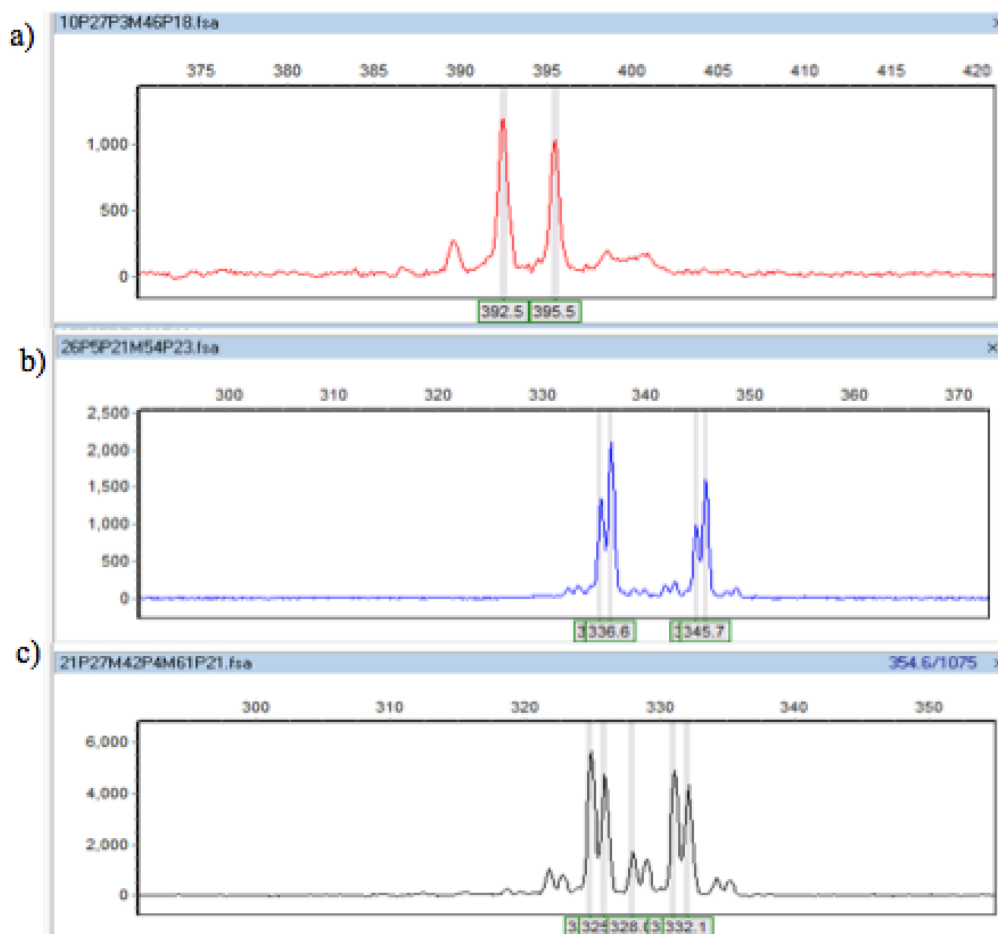
Anexo 2.- Fórmula de Likelihood Ratio Test para el cálculo de X_{LR}^2

Localidad	Nombre muestra	Cuantificación ng/uL	Coordenadas	Altura sobre nivel del mar (m)
El Basurero	YBA1	120,3	0° 52.411'S 91° 0.195'O	138
El Basurero	YBA2	71,3	0° 52.329'S 91° 0.167'O	130
El Basurero	YBA3	117,1	0° 52.410'S 91° 0.210'O	123
El Basurero	YBA4	1183,9	0° 52.409'S 91° 0.177'O	121
El Basurero	YBA5	161,8	0° 52.419'S 91° 0.176'O	117
El Basurero	YBA6	121,8	0° 52.359'S 91° 0.137'O	120
El Basurero	YBA7	359,6	0° 52.367'S 91° 0.111'O	113
El Basurero	YBA8	234,5	0° 52.362'S 91° 0.153'O	121
El Mango	YMA1	84,3	0° 52.475'S 91° 0.410'O	142
El Mango	YMA2	288,2	0° 52.598'S 91° 0.492'O	157
El Mango	YMA3	62,3	0° 53.135'S 91° 0.430'O	124
El Mango	YMA4	180,2	0° 53.153'S 91° 0.394'O	119

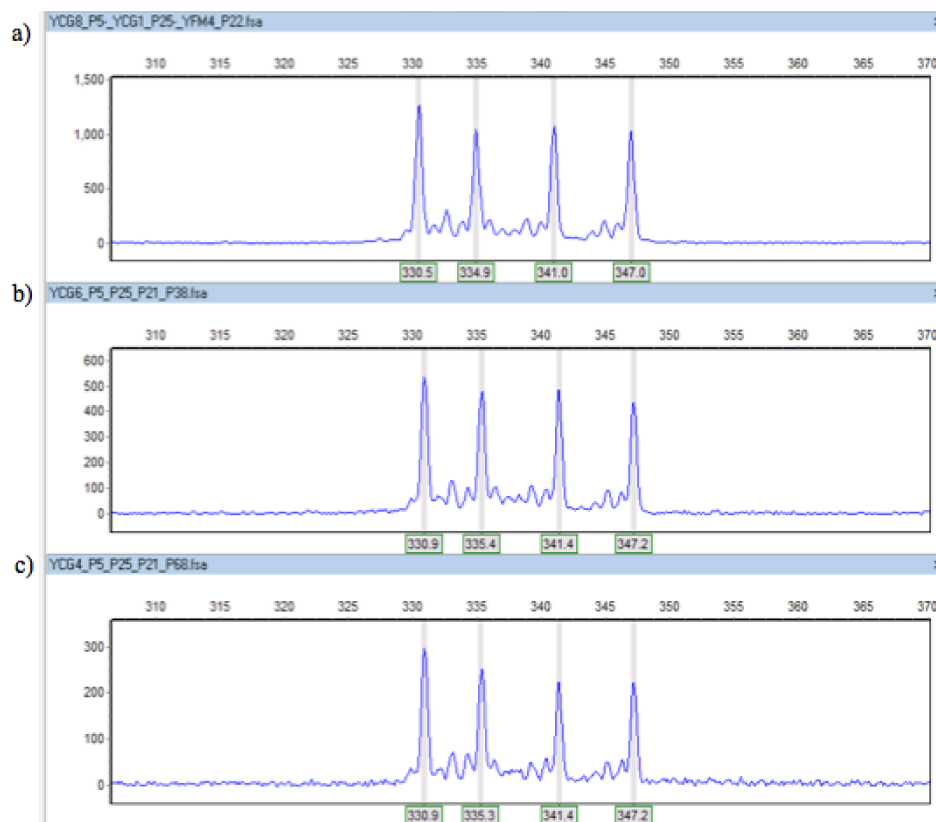
El Mango	YMA5	475,4	0° 53.182'S 91° 0.333'O	115
El Mango	YMA6	266,7	0° 53.205'S 91° 0.275'O	109
Barrio Loja	YBL1	330,5	0° 51.307'S 91° 00.122'O	173
Barrio Loja	YBL2	297,2	0° 51.211'S 91° 00.051'O	167
Finca Ricardo García	YRG1	137,5	0° 51.290'S 91° 00.076'O	162
Finca Ricardo García	YRG2	161,3	0° 51.331'S 91° 00.060'O	156
Finca Ricardo García	YRG3	91	0° 51.332'S 91° 00.060'O	155
Finca Ricardo García	YRG4	306,9	0° 51.350'S 91° 00.027'O	150
Finca Ricardo García	YRG5	198,7	0° 51.313'S 91° 00.034'O	148
Finca Ricardo García	YRG6	439,4	0° 51.281'S 91° 00.036'O	152
Finca Ricardo García	YRG7	295,6	0° 51.308'S 91° 00.023'O	148
Finca Ricardo García	YRG8	333,5	0° 51.326'S 91° 00.002'O	146
Finca Ricardo García	YRG9	296,1	0° 51.308'S 91° 59.571'O	142
Finca Ricardo García	YRG10	94,7	0° 51.290'S 91° 59.580'O	135
Finca Ricardo García	YRG11	133,4	0° 51.275'S 91° 59.592'O	142
Finca Ricardo García	YRG12	51,5	0° 51.277'S 91° 00.011'O	140
Finca Morocho	YFM1	111,7	0° 51.277'S 90° 59.588'O	141
Finca Morocho	YFM2	244,5	0° 51.270'S 90° 59.580'O	138
Finca Morocho	YFM3	184,8	0° 51.296'S 90° 59.570'O	133
Finca Morocho	YFM4	141,2	0° 51.277'S 90° 59.532'O	127
Finca Morocho	YFM5	257,9	0° 51.269'S 90° 59.526'O	127
Finca Morocho	YFM6	239,4	0° 51.252'S 90° 59.515'O	133
Finca Morocho	YFM7	244,9	0° 51.240'S 90° 59.505'O	130
Finca Morocho	YFM8	133,7	0° 51.233'S 90° 59.503'O	131
Finca Morocho	YFM9	145,4	0° 51.218'S 90° 59.493'O	128
Finca Morocho	YFM10	211,6	0° 51.198'S 90° 59.479'O	130
Finca Morocho	YFM11	216,5	0° 51.166'S 90° 59.468'O	129
Finca Morocho	YFM12	193,4	0° 51.154'S 90° 59.464'O	130
Finca Morocho	YFM13	222,1	0° 51.074'S 90° 59.440'O	133
Finca Morocho	YFM14	189,7	0° 51.059'S 90° 59.441'O	139
Finca Morocho	YFM15	51,1	0° 51.040'S 90° 59.442'O	144
Finca Morocho	YFM16	319,5	0° 51.028'S 90° 59.446'O	156
Finca Morocho	YFM17	371,6	0° 51.016'S 90° 59.450'O	154
Finca Morocho	YFM18	257,4	0° 50.585'S 90° 59.463'O	159
Finca Morocho	YFM19	260,9	0° 50.573'S 90° 59.467'O	157
Finca Morocho	YFM20	374,7	0° 50.524'S 90° 59.480'O	166
Cerro Grande	YCG1	354,5	0° 50.110'S 91° 00.060'O	222
Cerro Grande	YCG2	85,5	0° 50.072'S 91° 00.085'O	224
Cerro Grande	YCG3	328,3	0° 50.163'S 91° 00.031'O	224
Cerro Grande	YCG4	364,8	0° 50.040'S 91° 00.101'O	237
Cerro Grande	YCG5	167,8	0° 50.007'S 91° 00.121'O	243
Cerro Grande	YCG6	247,8	0° 49.563'S 91° 00.138'O	246
Cerro Grande	YCG7	430,7	0° 49.524'S 91° 00.141'O	252
Cerro Grande	YCG8	250,6	0° 49.504'S 91° 00.162'O	255
Cerro Grande	YCG9	453,8	0° 49.509'S 91° 00.166'O	256

Cerro Grande	YCG10	128,7	0° 49.516'S 91° 00.177'O	257
Cerro Grande	YCG11	126,1	0° 49.481'S 91° 00.147'O	260
Cerro Grande	YCG12	28,9	0° 49.510'S 91° 00.216'O	261
Cerro Grande	YCG13	132,1	0° 49.496'S 91° 00.241'O	262
Cerro Grande	YCG14	99,5	0° 49.444'S 91° 00.151'O	263
Cerro Grande	YCG15	76,5	0° 49.495'S 91° 00.243'O	264
Cerro Grande	YCG16	46,3	0° 49.506'S 91° 00.215'O	264
Cerro Grande	YCG17	35,7	0° 49.421'S 91° 00.184'O	268
Cerro Grande	YCG18	50,6	0° 49.413'S 91° 00.222'O	281
Cerro Grande	YCG19	249,3	0° 49.404'S 91° 00.264'O	286
San Joaquín	YSJ1	53,2	0° 49.445'S 91° 01.139'O	354
San Joaquín	YSJ2	374,2	0° 49.164'S 91° 01.371'O	386
San Joaquín	YSJ3	753,9	0° 49.170'S 91° 01.350'O	384
San Joaquín	YSJ4	95,9	0° 49.179'S 91° 01.349'O	385
San Joaquín	YSJ5	105,8	0° 49.169'S 91° 01.388'O	377
San Joaquín	YSJ6	41,4	0° 49.157'S 91° 01.346'O	385
San Joaquín	YSJ7	13,3	0° 49.157'S 91° 01.360'O	384
San Joaquín	YSJ8	97,2	0° 49.121'S 91° 01.356'O	385
San Joaquín	YSJ9	78,8	0° 49.132'S 91° 01.333'O	384
San Joaquín	YSJ12	309,7	0° 49.130'S 91° 01.304'O	380
San Joaquín	YSJ13	200,8	0° 49.109'S 91° 01.327'O	382
San Joaquín	YSJ14	279,6	0° 49.108'S 91° 01.316'O	380
San Joaquín	YSJ15	341,4	0° 49.099'S 91° 01.310'O	378
San Joaquín	YSJ16	268,7	0° 49.099'S 91° 01.289'O	380
San Joaquín	YSJ17	85,4	0° 49.079'S 91° 01.278'O	375
San Joaquín	YSJ18	360,2	0° 49.058'S 91° 01.285'O	372
San Joaquín	YSJ19	210,1	0° 49.061'S 91° 01.304'O	374
San Joaquín	YSJ20	299,7	0° 49.089'S 91° 01.296'O	376

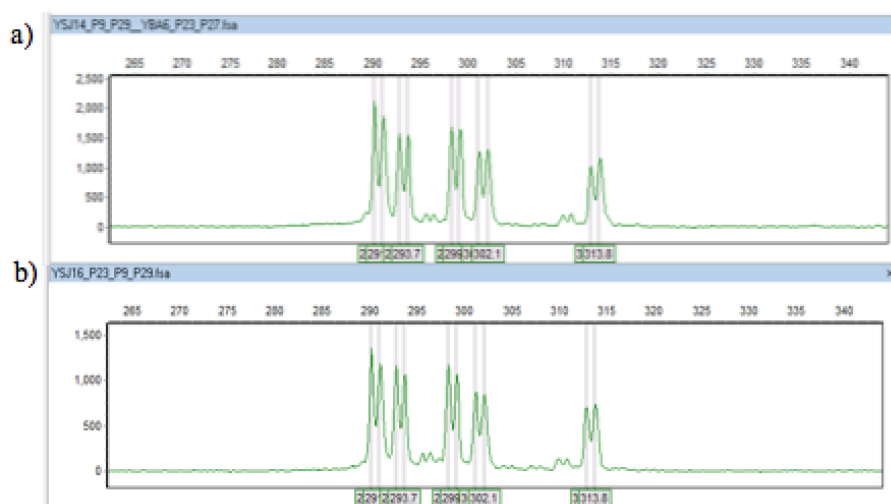
Anexo 3.- 86 muestras recolectadas de 7 localidades en la Isla Isabela, cuantificación en ng/ul, coordenadas de recolección y altura de los individuos sobre el nivel del mar.



Anexo 4.- Picos de fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker. a) Individuo YSJ3 amplificado con el primer GYB18 y fluoróforo PET, se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 392 Y 395 pb. b) Individuo YRG1 amplificado con el primer GYB23 y fluoróforo FAM, se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 336 y 345 pb. c) Individuo YCG13 amplificado con el primer GYB4 y fluoróforo NED se muestran dos alelos (heterocigotos) con tamaños de 324 y 333 pb



Anexo 5.- Picos e fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker de los amplicones del locus GBY25 para 3 individuos (a. YCG1, b.YCG6, c. YCG4) de *P.galapageium* muestreados en la Isla Isabela. Se reportaron 4 alelos en este locus para la población estudiado, es decir una ploidía 4n confirmada. Individuos amplificados con el primer GYB25 y fluoróforo FAM se muestran cuatro alelos con tamaños de 329, 334, 341, 347 pb.



Anexo 6.- Picos de fluorescencia obtenidos en el software de análisis GeneMarker de los amplicones del locus GBY9 para 2 individuos (a. YSJ14, b.YSJ16) de *P.galapageium* muestreados en la Isla Isabela. Se reportaron 3 alelos en este locus para la población estudiado, es decir una tetraploidía confirmada. Individuos amplificados con el primer GYB9 y fluoróforo VIC se muestran tres alelos con tamaños de 290, 293, 302, 314 pb

$$Nm = \frac{0.5 (1 - F_{st})}{F_{st}}$$

Anexo 7.- Fórmula para el cálculo de Nm (número de migrantes) Valores menores a 1 predomina la deriva génica, valores mayores a 1 predomina el flujo génico (Uribe, 2014).