

ANÁLISIS DEL ESTADO GENÉTICO DE LAS POBLACIONES DE *Espeletia pycnophylla*
Cuatrec. EN EL COMPLEJO DE PÁRAMOS LA COCHA-PATASCOY (NARIÑO-
COLOMBIA).

VÍCTOR JAVIER MARTÍNEZ COLLAZOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
BIOLOGÍA
2016

ANÁLISIS DEL ESTADO GENÉTICO DE LAS POBLACIONES DE *Espeletia pycnophylla*
Cuatrec. EN EL COMPLEJO DE PÁRAMOS LA COCHA-PATASCOY (NARIÑO-
COLOMBIA)

VÍCTOR JAVIER MARTÍNEZ COLLAZOS

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de Biólogo

Directora:
LUZ ESTELA LAGOS
Msc. Ciencias biológicas

Asesor acompañante:
SANDRA LORENA ÁLVARES ORDOÑES
Msc. CIENCIAS AGRARIAS CON ÉNFASIS EN PRODUCCIÓN DE CULTIVOS

UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES
BIOLOGÍA
2016

Las líneas y conclusiones aportadas son responsabilidad de los autores

Artículo 1ro N°324 de octubre de 1966 emanado por el Honorable Consejo Superior Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de aceptación

Luz Estela Lagos Mora

Directora

Sandra Lorena Alvares Ordoñez

Asesor acompañante

Sonia Mahecha

Jurado

Mónica Castañeda

Jurado

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Nariño, al programa de Biología y a todos sus profesores por la educación y formación como profesional que me brindaron en estos años,

A mi asesoras Luz E. Lagos y Sandra L. Álvarez por toda la dedicación, cariño y conocimiento que me dedicaron en esta etapa final de mi educación.

A mis jurados Sonia Mahecha y Mónica Castañeda por haber aportado a mi formación tanto profesional como personal.

Al grupo de investigación GENPAT por abrirme las puertas y apoyarme en la realización de este trabajo. Agradeciendo infinitamente la amistad de Diana, Aura y Harold.

Al grupo de investigación «Biología de Páramos y Ecosistemas Andinos» de la Universidad de Nariño y a Paula Escobar por la ayuda en la realización de la metodología de este proyecto.

A los profesores Germán Narváez y Aida E. Baca por sus explicaciones y aportes a la construcción de este trabajo.

A todos mis compañeros, amigos y futuros colegas por haber compartido y vivido la extraordinaria experiencia de estudiar biología.

Por ultimo agradezco el apoyo incondicional de mis padres, mis hermanas y mis abuelos, ellos han sido mi soporte y la motivación que necesité para culminar esta etapa de mi vida.

RESUMEN

Uno de los ecosistemas estratégicos son los páramos, los cuales constituyen el último cinturón de vegetación, presentan múltiples servicios ambientales y cumplen importantes funciones naturales tales como las relacionadas con su capacidad de interceptación, almacenamiento, regulación hídrica, captación de carbono y aprovisionamiento de plantas medicinales. En el departamento de Nariño se localizan tres complejos de páramos: Chiles-Cumbal, Doña Juana-Cerro Juanoy y La Cocha-Patascoy, este último constituye el principal recurso hídrico para el municipio de Pasto, además de nutrir al Humedal Internacional Ramsar de la laguna de la Cocha. Una de las particularidades principales del complejo es que alberga una gran riqueza de flora silvestre destacándose los frailejones (*Espeletia*), claves para la conservación de los páramos y su biodiversidad debido a la funcionalidad y múltiples relaciones interespecíficas.

Desde el punto de vista biológico los frailejones surgen a partir del último evento de especiación del complejo Espeletia, que ha experimentado altas tasas de diversificación en los páramos tropicales, conformando un total de ocho géneros y más de 100 especies. Una de ellas es *E. pycnophylla*, identificada como endémica para el ecosistema de páramo y cuya distribución geográfica es actualmente muy fragmentada, existiendo varias poblaciones en el departamento de Nariño, norte y centro del Ecuador. A través de su historia, probablemente ha sufrido procesos de cuellos de botella y/o derivas genéticas que pudieron aumentar las tasas de endogamia que a su vez reflejarían una pérdida en la variabilidad genética de las poblaciones actuales.

El objetivo de esta investigación fue evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *E. pycnophylla* mediante la técnica de PCR-RFLP en espaciadores intergénicos de ADN del cloroplasto en un total de 30 individuos colectados en los páramos de Santa Lucia, Morasurco y Ovejas correspondientes al complejo La Cocha-Patascoy. Como resultado se obtuvo 17 haplotipos, seis con la región intergenica trnQ, dos con la región trnL(UAG) y nueve con la región ndhF. Los análisis estadísticos AMOVA indicaron una baja variabilidad entre los sitios muestreados y alta variabilidad dentro de ellos, lo cual permite plantear la existencia de una sola población de *E. pycnophylla* en el complejo de páramos La Cocha – Patascoy.

Palabras clave: Páramos, *Espeletia pycnophylla*, variabilidad genética y PCR-RFLP

ABSTRACT

One of the strategic ecosystems are the Páramos, which join the last vegetation belt, have multiple environmental services and do important natural functions such as those related to its capacity of interception, storage, water regulation, carbon sequestration and provisioning of medicinal plants. The department of Nariño has three complexes of Páramos: Chiles-Cumbal, Doña Juana-Cerro Juanoy and Cocha-Patascoy, the latter is the main water resource for the Pasto city, besides nourishing the Wetland International Ramsar of the Laguna de la Cocha. One of the main particularities of the complex is that hosts a great wealth of flora highlighting the frailejones (*Espeletia*), key to conservation of the moors and its biodiversity due to the functionality and multiple interspecific relationships.

From the biological point of view the frailejones emerge from the last event of speciation of the complex *Espeletia*, which has experienced high rates of diversification in the páramos, making a total of eight genera and more than 100 species. One of them is *E. pycnophylla*, identified as endemic for the ecosystem of páramo and whose geographical distribution is now very fragmented, and there are several populations isolates in Nariño, north and center of Ecuador. Through its history, has probably suffered processes of bottlenecks and/or drifts genes that could increase the rates of inbreeding that in turn would show a loss in the genetic variability of the present populations.

The goal of this research was to check the genetic variability of the populations of *E. pycnophylla* using the technique of PCR-RFLP in spacers intergénicos of DNA chloroplast in a total of 30 individuals collected in the mountains of Santa Lucia, Morasurco and Ovejas for the complex La Cocha-Patascoy. As a result was get 17 haplotypes, six with the intergenic region trnQ, two with the region trnL(UAG) and nine with the region ndhF. The statistical analyzes AMOVA indicated a low variability among the sampled sites and high variability within them, which allows arise from existence of a single population of *E. pycnophylla* in the complex of páramos La Cocha – Patascoy.

Key words: Páramos, *Espeletia pycnophylla*, Genetic variability y PCR-RFLP

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	6
ABSTRACT.....	7
INTRODUCCIÓN	13
1. PROBLEMA.....	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo general.....	16
2.2. Objetivo específicos.....	16
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. MARCO TEÓRICO.....	19
4.1. ECOSISTEMAS PARAMUNOS	19
4.1.1. El páramo	19
4.1.2. Características del ecosistema de páramo	20
4.1.3. Origen del páramo.....	20
4.1.4. Distribución de los páramos en Nariño.....	22
4.2. FRAILEJONES: COMPLEJO ESPELETIA	23
4.2.1 Descripción del complejo Espeletia	23
4.2.2. Genero Espeletia	24
4.2.3. <i>Espeletia pycnophylla</i>	25
4.3. GENOMA DEL CLOROPLASTO.....	26
4.3.1. Generalidades del ADN de cloroplasto (ADNcp).....	26
4.3.2. Variabilidad del ADN del cloroplasto.....	27
4.4. MARCADORES MOLECULARES	28
4.4.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	29

5.	ANTECEDENTES.....	31
6.	METODOLOGÍA	34
6.1.	ÁREA DE ESTUDIO	34
6.2.	RECOLECCIÓN DE TEJIDOS VEGETALES.....	37
6.3.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	38
6.4.	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP).....	39
6.4.1.	Amplificación.....	39
6.4.2.	Digestión con enzimas de restricción.....	40
6.5.	ANÁLISIS DE DATOS.....	41
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
7.1.	EXTRACCIÓN DE ADN.....	42
7.2.	Amplificación de las regiones intergenicas de ADN de cloroplasto.....	43
7.3.	Digestión de las regiones intergenicas amplificadas.....	45
7.4.	ANÁLISIS DE DATOS.....	50
	CONCLUSIONES	57
	RECOMENDACIONES.....	58
	LITERATURA CITADA	59

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Categorización de los genes presentes en el ADN de cloroplasto.....	27
Tabla 2. Coordenadas y altura sobre el nivel del mar de los puntos muestreados dentro de los páramos seleccionados.....	34
Tabla 3. Lista de primers de regiones intergénicas del genoma de cloroplasto.....	39
Tabla 4. Descripción de las enzimas de restricción evaluadas <i>in silico</i>	40
Tabla 5. Cuantificación por espectrofotometría en Nanodroop 2000C.....	42
Tabla 6. Gradiente de temperatura para la amplificación de las regiones intergénicas.....	43
Tabla 7. Polimorfismos generados <i>in silico</i> con la técnica PCR-RFLP.....	46
Tabla 8. Haplotipos presentes en las regiones intergénicas estudiadas.....	46
Tabla 9. Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las tres regiones intergénicas de ADNcp de <i>E.pycnophylla</i>	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica del genoma de cloroplasto	26
Figura 2. Zonas escogidas para la toma de muestras del complejo de páramos La Cocha	35
Figura 3. Zona de muestreo Morasurco, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño.	36
Figura 4. Zona de muestreo Ovejas, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño.....	36
Figura 5. Zona de muestreo Santa Lucia, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño.....	37
Figura 6. Recolección tejidos vegetales.....	37
Figura 7. Extracción de ADN de <i>E. pycnophylla</i>	42
Figura 8. Fotografías de geles de Agarosa teñidos con bromuro de Etidio y visualizados en un transiluminador.	45
Figura 9. Patrones de bandeo de la región trnQ.....	47
Figura 10. Patrones de bandeo de la región ndhF	48
Figura 11. Patrones de bandeo de la región trnL(UAG).....	49
Figura 12. Mapa de distribución del género <i>Espeletia</i> cuya área de distribución coincide con la formación geológica de los andes	52
Figura 13. Especies polinizadoras comunes en <i>E. grandiflora</i>	53
Figura 14. Observación <i>in situ</i> de representantes del género <i>Bombus</i> en visitas activas sobre <i>E. pycnophylla</i>	54

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1.Revisión bibliográfica de estudios basados en el análisis de variabilidad genética usando la técnica PCR-RFLP en plantas.	66
Anexo 2. Capturas de pantalla de los resultados obtenidos de la digestión con enzimas de restricción i <i>in silico</i>	67

INTRODUCCIÓN

El páramo es un bioma neotropical que ha sido definido como extensas zonas que coronan las cordilleras entre el bosque andino y el límite inferior de las nieves perpetuas. Está determinada como región natural por la relación entre el suelo, el clima, la biota y la influencia humana. Es el ecosistema con mayor irradiación solar del mundo, lo que genera la flora de montaña más rica del planeta. Cuentan con un suelo cubierto de pajonales, humedales y turberas con presencia de especies particulares como los frailejones (Rangel-Ch 2000).

En el departamento de Nariño los frailejones son considerados como especie emblemática, no solo por su valor cultural y social sino también por su rol en el ecosistema de páramo. Esta especie es endémica del ecosistema de alta montaña del suroccidente colombiano, norte y centro del Ecuador y actualmente su distribución biogeográfica se encuentra fragmentada. Este aislamiento ocasionado por diversos factores como fallas geológicas, intervención antrópica, deforestación, etc., hace suponer que probablemente exista un detrimento a la variabilidad genética de esta especie debido a procesos de deriva genética o cuellos de botella (Benavides, et al 2010).

Las múltiples modificaciones que tienen lugar en los ambientes naturales resaltan el concepto y la importancia de la variabilidad genética, atributo fundamental en una población sobre la que continuamente actúan procesos de selección permitiendo que las poblaciones se adapten a nuevas situaciones. Una reducida variabilidad por lo general resulta en un incremento de los niveles de endogamia, que en el transcurso del tiempo puede causar una disminución de la eficacia biológica de los individuos y la población (Allendorf et al., 2013).

Bajo este contexto se resalta la necesidad de conocer el estado genético actual de las especies que habitan en nuestra región haciendo uso de técnicas a nivel molecular de fácil implementación en los laboratorios. Con este trabajo pionero se encontró que a pesar de encontrar un aislamiento geográfico marcado entre las poblaciones de *E. pycnophylla* estudiadas, estas tienen estrategias tan fuertes que permiten mantener una alta variabilidad entre ellas, manifestándose como una sola población.

1. PROBLEMA

La zona andina nariñense hace parte de los Andes septentrionales y se caracteriza por su relieve de origen volcánico, el cual ha originado diversas geoformas montañosas que contribuyen al desarrollo de zonas de páramo como ecosistemas estratégicos para la región (Solarte et al., 2007). El departamento de Nariño posee tres complejos de páramos: Chiles-Cumbal, Doña Juana-Cerro Juanoy y La Cocha-Patascoy, siendo este último la principal fuente hídrica para el municipio de Pasto, en el cual se encuentra el Humedal Internacional Ramsar Laguna de la Cocha, con el fin de proteger y conservar su riqueza cultural ambiental y paisajística (MINCIT, 2012). Un atributo de este complejo es la gran riqueza de comunidades y formaciones vegetales donde se distinguen bosques achaparrados, matorrales densos y ralos, pajonales, prados, turberas, rosetales y frailejones (Morales et al., 2007). Siendo los frailejones considerados como especies claves para la conservación de los páramos y su biodiversidad debido a su funcionalidad y sus múltiples relaciones interespecíficas (Diazgranados y Barber, 2012).

Los frailejones surgen a partir del último evento de especiación del complejo Espeletia, grupo de plantas que se originó en los Andes venezolanos durante el plioceno tardío y que ha sufrido altas tasas de diversificación en los páramos tropicales, dejando a su paso una gran radiación adaptativa con ocho géneros y más de 100 especies (Cuatrecasas, 1986; Monasterio y Sarmiento, 1991). Una de ellas es *E. pycnophylla*, identificada como endémica para el ecosistema de páramo y cuya distribución geográfica es actualmente muy fragmentada, existiendo varias poblaciones en el departamento de Nariño, norte y centro del Ecuador (Diazgranados, 2012). Benavides, Burbano, Burbano, Prieto, y Torres (2010), infieren que existe algún grado de divergencia entre poblaciones de *E. pycnophylla* aisladas por flujo genético restringido y deriva genética, lo cual puede incrementar la probabilidad de tasas de endogamia. Godoy (2009), afirma que el incremento de cruces consanguíneos en poblaciones endémicas reduce la variabilidad genética y el potencial adaptativo, que en casos extremos conducen a la extinción de las especies.

Hasta el momento las investigaciones realizadas en *E. pycnophylla* en el departamento de Nariño se han centrado en aspectos fisiológicos, fenológicos, sociales y culturales (Armero, 2004; Bedoya y Morillo, 2001; Erazo, 2011). El único trabajo a nivel genético en esta especie fue llevado a cabo por Benavides en el año 2010, quien realizó la evaluación de la divergencia poblacional en *E. pycnophylla* mediante aproximaciones morfométricas y paleográficas, encontrando variabilidad entre paramos del complejo la Cocha – Patascoy, sin embargo los autores sugieren enriquecer estos resultados mediante técnicas moleculares.

Teniendo en cuenta la problemática descrita, con este trabajo se respondió a la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la variabilidad genética intra e interpoblacional de *E. pycnophylla* en el complejo de páramos La Cocha – Patascoy en el departamento de Nariño?

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *E. pycnophylla* mediante el uso de marcadores PCR-RFLP de ADN cloroplástico.

2.2. Objetivo específicos

- Determinar la variabilidad genética intrapoblacional de *E. pycnophylla* en el complejo de páramos La Cocha-Patascoy.
- Determinar la variabilidad genética interpoblacional de *E. pycnophylla* en el complejo de páramos La Cocha-Patascoy.

3. JUSTIFICACIÓN

Los estudios enfocados a nivel genético en diferentes poblaciones constituyen el punto de interconexión entre las disciplinas de la genética y la conservación, debido a que en ambas se reconoce la importancia de mantener la integridad en las poblaciones locales y definir un contexto general que apunta a la aplicación de los conceptos de genética a la conservación de la biodiversidad, campo bien establecido en la actualidad (Allendorf, Luikart, y Sally, 2013).

De esta manera la genética aplicada a la conservación tiene un papel importante en actividades como el manejo y la reintroducción de poblaciones en cautiverio, restauración de comunidades biológicas, descripción e identificación de individuos, caracterización de la estructura genética poblacional, relaciones filogenéticas, detección y predicción de los efectos de pérdida de hábitats, fenómenos de fragmentación y aislamiento, entre muchas más (Hamilton, 2009).

La estructuración a nivel genético de las poblaciones vegetales es producto de la interacción de diferentes procesos, como selección natural, mutación, deriva, flujo génico, sistema reproductivo e historia evolutiva de la especie. Siendo esta última, la que involucra diversos factores ambientales tales como cambios en la distribución, fragmentación del hábitat y aislamiento poblacional (Sales, Nebauer, Mus, y Segura, 2001).

Las múltiples modificaciones que tienen lugar en los ambientes naturales resaltan el concepto y la importancia de la variabilidad genética, atributo fundamental en una población sobre la que continuamente actúan procesos de selección permitiendo que las poblaciones se adapten a nuevas situaciones. Una reducida variabilidad por lo general resulta en un incremento de los niveles de endogamia, que en el transcurso del tiempo puede causar una disminución de la eficacia biológica de los individuos y la población (Allendorf et al., 2013).

Por lo tanto, conocer la variabilidad genética de las poblaciones es importante para establecer estrategias de conservación de las especies y sus hábitats (Gaspar et al., 2006). Los estudios genéticos y ecológicos de las especies endémicas demuestran el cambio a través del

tiempo, ayudando a definir los parámetros genéticos adecuados para guiar y monitorear las acciones para la conservación de los ecosistemas (Kageyama, Gandara, y Souza, 1998). Bajo este contexto se planteó esta investigación pionera cuyo objetivo fue evaluar la variabilidad genética de *E. pycnophylla* mediante el análisis de tres regiones integénicas del genoma de cloroplasto utilizando la técnica PCR-RFLP.

4. MARCO TEÓRICO

4.1. ECOSISTEMAS PARAMUNOS

4.1.1. El páramo

Los páramos son ecosistemas únicos del neotrópico y se describen como zonas cuyas áreas reposan sobre las cumbres de las cordilleras entre el bosque andino y el límite de las nieves perpetuas y se establece como una zona natural al interactuar factores abióticos como el clima, el suelo con la biota y la influencia humana (Rangel-Ch, 2000). Este ecosistema aparte de ser único en el mundo, ofrece funciones de tipo ecológico, una biodiversidad muy particular y la capacidad de sus suelos de fijar carbono de la atmosfera y almacenar agua, inclusive de estos lugares nacen las cuencas hídricas que abastecen de agua a la población Colombiana (Cabrera y Ramírez, 2014).

Una particularidad de los páramos es su distribución fragmentada que forma un corredor interrumpido semejante a un “collar de perlas” entre la cordillera de Merida (Venezuela) hasta el norte del Perú y dos complejos más asilados que son los páramos centroamericanos (Costa Rica) y la Sierra nevada de Santa Marta (Colombia) (Medina y Hofstede, 2001).

Para Colombia se ha estimado una superficie aproximada de 2'906.137 hectáreas de este ecosistema, que se extienden sobre toda el área Andina y la Sierra Nevada de Santa Marta y dependiendo de la ubicación y topografía de cada cordillera, los páramos se pueden encontrar desde los 3.000 m.s.n.m, inclusive existen páramos azonales desde los 2.600 m.s.n.m. ubicados en el departamento de Nariño (Sarmiento, Cadena, Sarmiento y Zapata, 2013).

4.1.2. Características del ecosistema de páramo

Las particularidades que caracterizan a estos ecosistemas son producto de las condiciones atmosféricas, topológicas, climáticas, físicas y bióticas que predominan en los territorios de alta montaña y dentro de las cuales se pueden destacar: altos niveles de radiación UV, fuertes vientos, bajas temperaturas que oscilan en el día desde los menos 0°C hasta por encima de los 20°C, suelos ácidos poco desarrollados y ocurrencias de fuertes heladas (Luteyn, 1999). Este conjunto de condiciones abióticas afectan el crecimiento, almacenamiento de recursos, desarrollo, descomposición de biomasa muerta y absorción radicular, razón por la cual la productividad primaria en estos ecosistemas es baja (Sánchez, 2004).

Desde un punto de vista económico, industrial y social la característica más sobresaliente de los páramos es la capacidad de captación y regulación hídrica, la cual promueve el desarrollo y bienestar de las comunidades humanas, puesto que los asentamientos de estas giran en torno a la compleja red hidrológica nacional que se forma en estos ecosistemas de alta montaña (Solarte et al., 2007).

Bajo un contexto biológico, los páramos presentan una diversidad única, con altos índices de endemismo en todas las escalas de la cadena trófica, desde los descomponedores microscópicos hasta las aves y mamíferos de gran tamaño, quienes se distribuyen en cada una de las diferentes topologías y vegetaciones que conforman a estos ecosistemas de alta montaña. Esta diversidad ecosistémica, sumada a la fragmentación a manera de islas biogeográficas que por sus límites definidos, su flujo genético restringido y su reducido tamaño, forman escenarios propicios para el estudio de diferentes procesos evolutivos (Rangel-Ch, 2000; Särkinen, Pennington, Lavin, Simon, y Hughes, 2012).

4.1.3. Origen del páramo

Si bien el levantamiento de los Andes ocurrió hace 40 millones de años, fue en el Mioceno (hace 10 Ma atrás) que la cordillera de los Andes empezó formarse con la unión de

varios macizos. Ya en el Plioceno (5-3 Ma atrás) las cordilleras alcanzaron su altura máxima y presentaban áreas abiertas y extensas que sirvieron de base para la posterior colonización de la flora paramuna, estas zonas se encontraban por encima del límite altitudinal del bosque montano (Hofstede et al., 2014; Sklenář, Dušková, y Balslev, 2011).

Posteriormente, la inmigración de especies desde la región austral, holártica y mesoamericana a las zonas abiertas sin vegetación boscosa en las cimas de las cordilleras, fue precursora de la actual flora paramuna, la cual se ha denominado como vegetación protopáramo. Al final de este periodo los representantes florísticos de este ecosistema ya se encontraban presentes, sólo que su riqueza no era considerable (Morales et al., 2007; Sklenář et al., 2011). Más tarde en el Cuaternario (2,4 Ma atrás) los cambios de temperatura oscilaban entre ciclos interglaciales con temperaturas similares a las actuales y glaciales donde las temperaturas eran muy bajas y la humedad era alta, estos ciclos ayudaron al descenso de los glaciales en las cimas de las montañas hasta los 3.000m de altitud, con lo cual el límite bosque-páramo bajo localmente (Hofstede et al., 2014).

Al finalizar este periodo (aproximadamente 21.000 y los 14.000 años atrás) continuaban las bajas temperaturas pero las condiciones de humedad eran más secas que antes, así, la extensión de los glaciales se redujo provocando que el área de páramo se extendiera cubriendo la mayoría de los lugares que se encontraban por encima de los 2.000 m, por lo cual las regiones paramunas que antes se encontraban aisladas quedaran unidas: la cordillera de Mérida en Venezuela, cordillera Oriental en Colombia y cordillera Central hasta Ecuador. Este ritmo glacial-interglacial, permitió la conexión y separación de las áreas de páramo y la modelación de las tierras tropicales altas, causando fenómenos de extinción, especiación y redistribución de la biota (Otero, Mosquera, Sílva, y Guzman, 2001).

En la época del Holoceno (6.000 años atrás), las condiciones del clima cambiaron drásticamente entrando en un periodo bastante cálido, lo cual permitió que los elementos del bosque Andino y el subpáramo ascendieran cientos de metros por encima del límite bosque-páramo actual, reduciendo notablemente el área del ecosistema de páramo, esto termino de moldear la topología actual de estos ecosistemas. Por ende, el bioma páramo por tener no más

de 3 millones de años, puede considerarse el más reciente de los ecosistemas formados en los Andes (Hofstede et al., 2014).

4.1.4. Distribución de los páramos en Nariño

En el departamento de Nariño la zona andina ubicada en la región septentrional de los Andes suramericanos permitió la consolidación de un solo macizo montañoso de origen volcánico que dió lugar al surgimiento de diversas geofomas, dentro de las cuales se encuentran los ecosistemas de páramo, que se extienden desde la frontera con el Ecuador hasta los límites con los departamentos del Cauca y Putumayo hacia el norte y oriente, diferenciando tres complejos paramunos: Chiles – Cumbal, Doña Juana – Cerro Juanoy y La Cocha – Patascoy (Solarte et al., 2007).

El complejo Chiles – Cumbal, se enmarca dentro del sector de páramos y bosques altoandinos Nariño – Putumayo, dentro del cual se han identificado doce ecosistemas naturales que ocupan el 75% de su área, el 25% de territorio se ha transformado por los cultivos de pastos, ganadería y vegetación de tipo secundaria. En el complejo se identifican cuatro zonas de vida Bosque húmedo-montano, subpáramo, páramo y superpáramo, dentro de los cuales se encuentran formaciones vegetales de tipo bosques (con árboles hasta los 15m de altura), matorrales, pastizales, pajonales, prados y turberas, donde se resalta la vegetación de tipo herbácea de macollas y rosetas, puyas, cojines y almohadillas (Morales et al., 2007; Solarte et al., 2007).

El complejo Doña Juana – Cerro Juanoy, representa la principal fuente hídrica para el norte de Nariño, de este nacen los ríos Guachinoco y Juanambu que desembocan en la cuenca del Patía, está formado por un complejo de volcanes como Doña Juana, Petacas, Ánimas y cerros potosí y Juanoy. Este complejo lo comparten los departamentos de Nariño y el Cauca, con una extensión aproximada de Se ubica en los departamentos de Cauca, Nariño y Putumayo, entre los 3.300 y 4.180 msnm y su extensión es de 69.263 hectáreas. La mayor

parte del complejo se encuentra en los municipios de Santa Rosa (Cauca), San Francisco (Putumayo), El Tablón y La Cruz (Nariño) (Morales et al., 2007; Solarte et al., 2007).

El complejo La Cocha-Patascoy está en las áreas políticas de los departamentos de Nariño y el Putumayo, en este complejo se identifican 30 ecosistemas, de los cuales el 70% corresponden a páramos, el resto se divide entre bosques altoandinos, superpáramo. Sus condiciones climáticas varían de húmedas a muy húmedas con temperaturas por debajo de los 15°C, su topología es resultado de geformas hidrovulcánicas y fluvigravitacionales. Cabe resaltar que dentro de este complejo existen zonas que residen en depósitos lacustres geológicamente recientes, a los cuales se los ha denominado como páramos azonales por estar ubicados en una franja altitudinal menos a la normal en un rango desde los 2.600 m.s.n.m. (Solarte et al., 2007)

Otra particularidad de este complejo es su ubicación en una zona de alta actividad volcánica, que ha modelado su topología y orogenia. Los flujos de lava y material piroclástico reciente recubren todo el complejo, además existen geformas vestigiales de procesos de glaciación antiguos como los circos glaciales ubicados en el sector de la laguna Negra del Santuario de Flora y Fauna Galeras. En el complejo se originan los afluentes que alimentan los cauces de los ríos Putumayo, Chingual y San Miguel, cuyas aguas van al área hidrográfica del Amazonas, mientras que hacia la del Pacífico drenan los tributarios de los ríos Juanambú y Guáitara (Morales et al., 2007; Solarte et al., 2007).

4.2. FRAILEJONES: COMPLEJO ESPELETIA

4.2.1 Descripción del complejo Espeletia

El complejo Espeletia pertenece a la familia Asteraceae, subfamilia Heliantheae y forma la subtribu Espletiinae, se encuentra distribuido en los países norandinos Venezuela, Colombia y Ecuador. Sus ocho géneros (*Coespeletia*, *Espeletia*, *Espeletiopsis*, *Paramiflos*, *Carramboa*, *Libanothamnus*, *Ruilopezia* y *Tamania*) comprenden más de 100 especies (Cuatrecasas, 1986; Diazgranados, 2012).

Una de las principales características del complejo es su diversidad de morfologías desde árboles caulescentes hasta rosetas sésiles de pequeño porte, además de habitar en un rango altitudinal que va desde los 2.000 hasta los 4.500 m.s.n.m. Las formas de crecimiento constituyen un ejemplo de adaptación a las presiones que ejerce el ecosistema. Este éxito ecológico del grupo se debe a las adaptaciones como dinámica de crecimiento, reproducción y patrones de repartición equitativa de energía y biomasa (Monasterio y Sarmiento, 1991).

4.2.2. Genero Espeletia

El origen de este género es incierto, se infiere que fue en el periodo glacial del Pleistoceno en la cordillera occidental de Venezuela a partir de un taxón proto-espeletia que sufrió un proceso de radiación adaptativa acelerado dándole la capacidad de colonizar diferentes hábitats y por ende dio lugar a una gran variedad de formas de vida y patrones de reproducción (Monasterio y Sarmiento, 1991).

Las especies del género son gregarias y poseen especializaciones para climas fríos y húmedos. Además, de las adaptaciones que caracterizan al complejo Espeletiinae, en este género predominan la conservación de la temperatura favorable y el balance hídrico (Monasterio y Sarmiento, 1991) El mecanismo más común entre las especies que componen el género es el superenfriamiento, el cual les permite resistir temperaturas bajo cero (Squeo, Rada, Azocar, y Goldstein, 1991). La floración en estas especies se da en época húmeda, la dispersión de los frutos inicia con la estación lluviosa y la germinación se da en época seca (Cavellier et al., 1992).

La arquitectura básica del género consta de una estructura monocaule construida por un único meristemo aéreo apical el cual es responsable del crecimiento de toda la biomasa vegetativa (tronco y hojas de la roseta). El sistema radical se constituye por una serie de yemas independientes. Las inflorescencias son generalmente laterales, producidas por yemas que se activan en su correspondiente fase fenológica en las axilas de las hojas jóvenes de la roseta, en consecuencia el crecimiento es indeterminado ya que no se ve interrumpido por la

reproducción y las especies son policárpicas. En estas especies no hay abscisión foliar, las hojas permanecen insertas en el tronco y se descomponen muy lentamente a lo largo del ciclo de vida de cada individuo formando una envoltura de hojas marcescentes hasta su base (Smith, 1981).

4.2.3. *Espeletia pycnophylla*

De acuerdo Diazgranados (2012), la posición taxonómica de la especie es la siguiente: Reino: Plantae; Division: Angiospermae; Clado: Eudicotiledoneas; Subclado: Asteridas; Orden: Asterales; Familia: Asteraceae; Subfamilia: Asteroideae; Tribu: Heliantheae; Subtribu Espeletiinae; Genero: *Espeletia*; Especie: *Espeletia pycnophylla*.

Cuatrecasas 1986 describe a esta especie como “Es una roseta caulescente, perenne, con hojas sésiles, dispuestas en espiral, margen entera, anchas densamente pubescentes, obovadas-oblongas. Vainas grandes, imbricadas y adpresas al tallo. El fuste no se ramifica y está conformado por hojas marchitas que conforman la necromasa, la cual ayuda a la protección de las condiciones ambientales severas. Presenta pedúnculo largo con inflorescencias compuestas, axilares con brácteas foliáceas. Capítulos dispuestos en cimas. Capítulos heterógamos radiados. Involucro copuliforme, densamente pubescente. Brácteas en tres series, imbricadas, tomentosas. Receptáculo recto o ligeramente convexo. Paleas oblongas, persistentes, envolviendo a las flores. Flores del radio femeninas entre 40-60, liguladas, amarillas. Tubo corto cubierto por abundantes pelos, lígula con ápice dentado. Estilo delgado, bífido. Flores del disco masculinas; corola tubular, lobulada, amarilla a café. Antenas con apéndice apical ovado. Nectario dentado. Aquenios abovoides, angulados, sin estrías”.

4.3. GENOMA DEL CLOROPLASTO

4.3.1. Generalidades del ADN de cloroplasto (ADNcp)

En los primeros estudios se consideraba este genoma como una molécula circular, hoy en día con el empleo de técnicas de hibridación *in situ* se ha demostrado que solo una proporción menor de las moléculas presenta este tipo de forma y por lo general se encuentra concatenado en dos o más moléculas en lineales y circulares y circular en donde se pueden identificar dos regiones LSC (Large single copy) y SSC (Short Single Copy) ((Figural) (Wicke, Schneeweiss, DePamphilis, Miller, y Quandt, 2011).

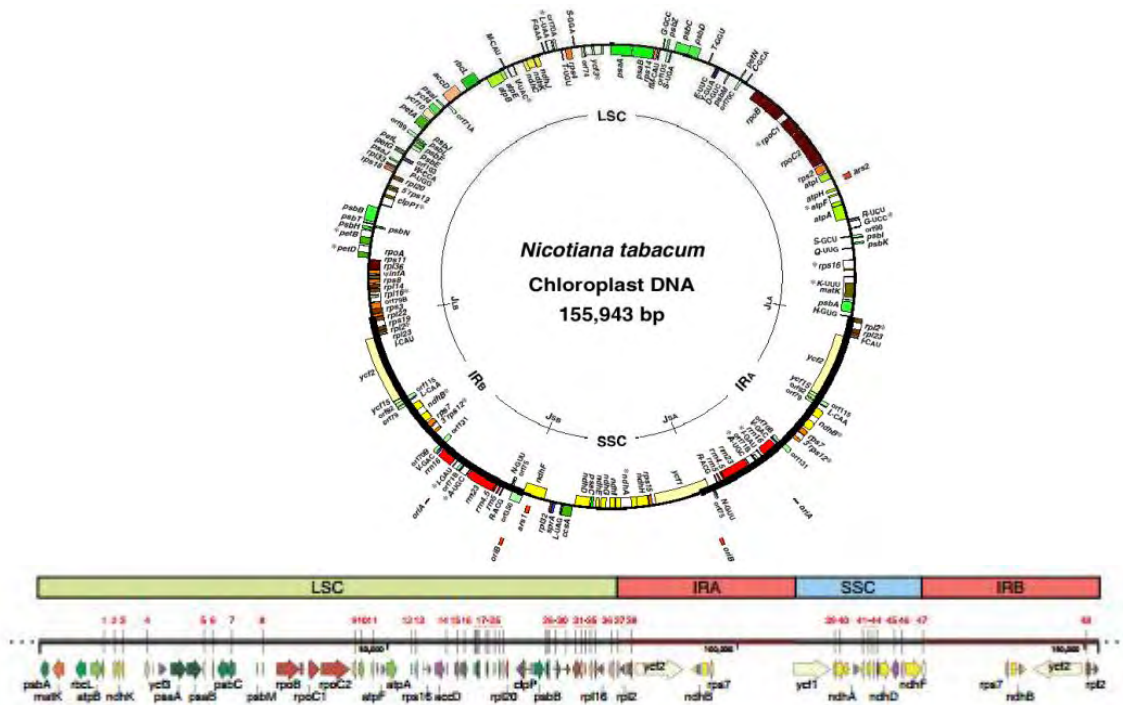


Figura 1. Representación gráfica del genoma de cloroplasto. **Fuente:** Daniell, Lin, Yu y Chang (2016)

El tamaño del genoma varía entre especies (120- 180Kb), se caracteriza por presentar centenares de copias organizadas en nucleoides dentro de las membranas tilacoidales de los cloroplastos (Mache y Lerbs, 2001). Incluye 120-130 genes que codifican principalmente para proteínas de fotosíntesis y regulan procesos de transcripción y traducción, en general estos

genes se los puede categorizar en tres grupos: el primero los del sistema fotosintético incluidos los que sintetizan las proteínas reguladoras del ciclo de Calvin, el segundo los genes responsables de la regulación de la ARNpolimerasa y la formación de las subunidades de los ribosomas y el tercero los genes que codifican para pigmentos, ácidos grasos y proteínas dependientes de ATP (Tabla 1)(Zheng, Chen, Hao, y Shi, 2016).

Tabla 1. Categorización de los genes presentes en el ADN de cloroplasto.

Sistema fotosintético	Subunidades del fotosistema I	del psaA, psaB, psaC, psaI, psaJ, psaM
	Subunidades del fotosistema II	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE, psbF, psbH, psbI, psbJ, psbK, psbL, psbM, psbN, psbT, psbZ
	Subunidades del citocromo	petA, petB, petD, petG, petL, petN
	Subunidades de la ATP sintasa	atpA, atpB, atpE, atpF, atpH, atpI
	Subunidades de la Rubisco	rbcL
Expresión de genes	ARN polimerasa	rpoA, rpoB, rpoC1, rpoC2
	Subunidades pequeñas y grandes del ribosoma	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11, rps12, rps14, rps15, rps16, rps18, rps19, rpl2, rpl14, rpl16, rpl20, rpl22, rpl23, rpl32, rpl33, rpl36
Otros		ccsA, cemA, clpP, matK, ycf3, ycf4

Fuente: Zheng y colaboradores (2016)

4.3.2. Variabilidad del ADN del cloroplasto

El genoma del cloroplasto en la mayoría de los organismos fotosintéticos es altamente conservado, en algunas especies las mutaciones de ADNcp ocurren espontáneamente (0,01-1,3%) en los individuos de una población. Por otra parte, sobre la base de comparaciones evolutivas, se ha deducido una tasa de mutación espontánea de genes cloroplásticos de $1.1-2.9 \times 10^{-9}$ sustituciones por sitio sinónimo por año, la que resulta muy inferior a la estimada para los genes nucleares, ($5.8-31.5 \times 10^{-9}$) (Muse, 2000).

Además, un genoma altamente conservado constituye una herramienta para la reconstrucción de eventos históricos responsables de la contracción o la expansión de las poblaciones y estudios de migración y colonización reflejan mejor los procesos de divergencia entre poblaciones vegetales al ser heredados por vía materna en las angiospermas (Bock, 2007). La probabilidad de encontrar variabilidad aumenta con el uso de marcadores genómicos de ADNcp, esto se debe a la cantidad de regiones no codificantes que posee (Daniell, Lin, Yu, y Chang, 2016). Shaw y colaboradores en el 2007, estudiaron la utilidad de secuencias no codificantes, proponiendo las siguientes regiones como propicias para el estudio de divergencias entre niveles de taxones bajos:

La región trnL(UAG) + rpl32 es un espaciador intergénico presente en la región SSC del genoma del cloroplasto, de las 34 regiones útiles en estudios moleculares a nivel poblacional, esta se ha identificado como altamente variable, su longitud oscila entre 543-1417 pb.

La región ndhF-rpl32 también es un espaciador intergénico de la región SSC del genoma del cloroplasto y se encuentra adyacente a la región rpl32-trnL(UAG), es complementaria a la región trnL(UAG) y por lo tanto es altamente variable. Su longitud varía entre 729 y 1254pb.

Las regiones trnQ + trnSr son espaciadores intergénicos ubicados en la región LSC del genoma del cloroplasto y han sido descritas como altamente variables. Se han utilizado en trabajos poblacionales en palmas (Arecaceae) y robles (*Quercus sp*). En promedio el fragmento de estas secuencias es de 1303 pb (Grivet, Heinze, Vendramin, y Petit, 2001).

4.4. MARCADORES MOLECULARES

Para muchos de los campos de biología como evolución, medicina, ciencia forense y genética, se requiere del uso de marcadores moleculares, puesto que estos permiten la identificación de polimorfismos de interés para diversos estudios (Renteria, 2007). Otro aporte eficiente de los marcadores moleculares está directamente relacionado al contexto de la

conservación ya que permite evaluar los estados de las especies, poblaciones o individuos, mediante estimaciones de consanguinidad, los cuales han sido útiles para demostrar los cruces endogámicos entre individuos de poblaciones silvestres (Godoy, 2009).

Los marcadores aplicados a genomas vegetales han tenido muchas aplicaciones como determinación de linajes, análisis de relaciones filogenéticas, creación de bancos de germoplasmas, mejoramiento genético y determinación de variabilidad genética. Esta última ha tenido un papel importante a nivel de la conservación, debido a que los marcadores se aplican a genomas del cloroplasto y mitocondrial, los cuales no poseen recombinación y se heredan por vía materna, esto facilita los análisis moleculares puesto que los alelos sólo pueden generarse a través de mutación y así es posible reconstruir genealogías, rutas de dispersión, diferenciación entre poblaciones, entre otras (Azofeifa-Delgado, 2006).

Por otro lado la característica de herencia materna en cloroplastos y mitocondrias hace que sólo tengan una copia de ese genoma, convirtiéndolos así en genomas haploides, lo cual implica que estos no sirven para estimar heterocigosis pero son usados para reconstruir patrones de flujo genico, a estos se conoce como haplotipos, los cuales son una combinación alélica a lo largo de un cromosoma (Bock, 2007). Aunque un cromosoma entero puede verse como un haplotipo, normalmente sólo se consideran regiones no mayores a 100Kbp con polimorfismos altamente ligados (Allendorf et al., 2013; Templeton, Boerwinkle, y Sing, 1987). En Angiospermas los niveles de estructuración genética de las poblaciones pueden ser definidos a través de haplotipos y la manera como estos se transmiten, puesto que al ser los organelos heredados vía materna, el flujo génico ocurre sólo por semillas. Así, en comparación con los genomas de herencia biparental, los marcadores heredados por vía materna detectan una mayor diferenciación genética entre las poblaciones (Goncalves, Barrandeguy, y García, 2014).

4.4.1. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Los RFLPs es una técnica que permite encontrar relativamente alto polimorfismo en muestras de ADN, además, de ser altamente reproducible. Dentro de sus ventajas están el

número ilimitado de ellos, sin dependencia de factores ambientales, no presentan efectos pleiotrópicos y con la posibilidad de ser analizados en cualquier etapa del desarrollo de la planta. Esencialmente, los RFLPs son originados por rearrreglos del ADN, los cuales pueden ser pérdidas, inserciones o sustituciones de nucleótidos, que reducen o amplían los sitios de restricción en los cuales actúan endonucleasas de restricción y fragmentan las secuencias nucleotídicas, esto se evidencia por las diferencias entre el peso molecular de los fragmentos generados (Agarwal, Shrivastava, y Padh, 2008).

El nivel de polimorfismo que la técnica tiene la capacidad de detectar depende de los primers empleados, las enzimas de restricción utilizadas y el nivel de complejidad del genoma de la especie analizada. El uso de los RFLP en plantas representa una buena opción para ejecutar numerosos estudios enfocados hacia alguno de los tres genomas presentes en las células vegetales. La aplicación de esta técnica ha sido de gran utilidad en estudios filogenéticos, identificación de cultivares para protección de la variabilidad y en investigaciones de la diversidad genética (Rasmussen, 2012).

Si bien el uso de PCR-RFLP se ha demostrado como una buena opción para el desarrollo de análisis poblacionales a nivel genético, presenta una serie de desventajas como el tiempo utilizado desde que se inicia hasta que se finaliza el proceso para el análisis de varias muestras, la dificultad de identificar la exacta variación en el evento en que múltiples SNPs afectan el mismo sitio de reconocimiento de la enzima y la más importante es que no se recomienda para el análisis de alto rendimiento puesto que no se puede realizar un análisis simultáneo de un gran número de SNPs diferentes debido a la necesidad de un par de primers específicos y enzimas de restricción para cada SNPs (Rasmussen, 2012).

5. ANTECEDENTES

Diazgranados y Barbet, en el marco del congreso de botánica (Ohio, 2012) expusieron la reconstrucción filogenética de la subtribu Espeletiinae, mediante el uso de diferentes marcadores moleculares de las regiones cloroplastídicas intrónicas, encontrando que este tipo de secuencias conservadas permite resolver relaciones filogenéticas por debajo del nivel de género y presentan una serie de regiones de alto polimorfismo a nivel intraespecífico muy útiles para trabajos poblacionales.

Benavides en el año 2010 realizó la evaluación de la divergencia poblacional en *E. pycnophylla*, mediante aproximaciones morfométricas y paleográficas. El objetivo de esta investigación fue comprobar la hipótesis de la existencia de divergencia morfométrica en seis poblaciones de *E. pycnophylla* aisladas geográficamente, un análisis que estuvo correlacionado con distancias espaciales y con eventos paleogeográficos de reducción y fragmentación de sus áreas de distribución. Todas las poblaciones presentaron diferencias significativas y correlaciones fuertes entre las matrices morfométricas, geográficas y paleogeográficas de las áreas de distribución. Los resultados obtenidos son acordes a escenarios continuos de vicarianza, reducción de áreas de distribución y flujo genético restringido.

Azpilicueta, Marchelli y Gallo en el año 2009, llevaron a cabo un estudio en poblaciones de la especie *Nothofagus obliqua* afectadas por los cambios climáticos sucedidos en las glaciaciones durante el cuaternario y que aún son residentes en la Patagonia. Para evaluar el impacto de esas fluctuaciones climáticas sobre la estructura genética de las poblaciones, realizaron un análisis filogeográfico haciendo uso de PCR-RFLP como marcador de ADN de cloroplasto. Encontraron que al analizar 11 regiones no codificantes del genoma de cloroplasto se encontraron 14 haplotipos diferentes y mediante el análisis estadístico obtuvieron como resultado un alta diferenciación genética de las poblaciones, esto les permitió concluir la existencia de una estructura filogeográfica en las poblaciones estudiadas.

Pock-Tsy y colaboradores en el año 2009, reconstruyeron la historia filogeográfica del complejo de poblaciones de la especie Baobab (*Adansonia digitata L.*) una emblemática especie de árbol tropical cuya distribución geográfica natural comprende la mayoría del África tropical, pero también se encuentra en parches aislados del sureste africano e islas en el océano atlántico e indico. Ellos a través de un análisis de cinco secuencias no codificantes de ADN de cloroplasto y haciendo uso de PCR-RFLP como marcador molecular pudieron detectar cinco haplotipos que les sirvieron de base para concluir una clara distribución geográfica estructurada en estas poblaciones.

Marchelliv y Gallo en el 2006, realizaron un análisis de los polimorfismos presentes en el ADN de cloroplasto para inferir la historia post-glacial de *Nothofagus nervosa* una especie endémica de bosques templados de Sur América. Ellos plantean dos hipótesis para explicar la distribución actual de las especies en relación con los refugios propuestos después de estudios palinológicos y el tiempo transcurrido desde la última máxima Glaciación. Si los refugios se encontraban sólo en la Cordillera de la costa, como los registros de polen indican, se debe hacer uso de los eventos de dispersión de larga distancia para explicar la distribución actual de la especie en latitudes meridionales. La hipótesis alternativa es la existencia de refugios crípticos en latitudes meridionales. Se analizaron un total de 26 poblaciones de la especie en Chile y Argentina a través de PCR-RFLP. Se identificaron cinco haplotipos, y se observó una variación intrapoblacional muy baja junto con una diferenciación genética alta. Los haplotipos indicaron una distribución geográfica muy estructurada, separando poblaciones de la costa Pacífica con poblaciones de los andes, además, la mayoría de las poblaciones en los andes presentaron una variación en la distribución de los haplotipos, lo que permite sugerir la persistencia de las especies en residir en refugios de la edad de hielo.

Palacio en el año 2005, desarrolló un estudio comparativo de la diversidad genética y divergencia evolutiva entre las poblaciones de *Colombolanus excelsa* y *Quercus humboldtii* para entender los efectos genéticos de los procesos poblacionales en estas dos especies y aportar información para su manejo y conservación, mediante el uso de la técnica PCR-RFLP encontrando que las poblaciones de *C. excelsa* no mostraron diferencias entre sí, mientras que las poblaciones de *Q. humboldtii* presentaron 5 haplotipos de distribución variable entre las

poblaciones. Así, pudo determinar que ambas especies tienen altos niveles de diversidad genética y que los valores de estructura son convergentes. En *Q. humboldtii* los valores de estructura genética pudieron ser producidos por procesos de colonización sucesivos, mientras que en *C. excelsa* se explicarían por el tiempo de aislamiento de las poblaciones.

Besnard, Khadari y Bervillé en el año 2002, estudiaron la diversidad genética en el olivo (*Olea europea*), usando PCR-RFLP como marcador molecular. Encontraron la presencia de quince Haplotipos que presentaron una alta diferenciación genética de las poblaciones y además les permitió distinguir los posibles puntos de origen de la diversificación de estas poblaciones.

Collada y colaboradores (2001), analizaron mediante técnica de PCR-RFLP la variación del ADN de cloroplasto (cp) y mitocondria (mt) en 31 sistemas forestales (13 con *Quercus suber*, 12 con *Q. ilex* y 6 con *Q. coccifera*) situados a lo largo del área de distribución natural de dichas especies, para lo cual usaron cinco pares de cebadores digeridos por las enzimas TaqI y HinfI, obteniendo como resultado 29 haplotipos, uno de ellos característico de *Q. suber*. La distribución de los haplotipos apunta una estructuración geográfica, siendo *Q. ilex* el de mayor de diversidad intrapoblacional.

6. METODOLOGÍA

6.1. ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de *E. pycnophyla* fueron colectadas en los páramos del complejo La Cocha-Patascoy (Figura 2), localizado al suroeste de Colombia en la confluencia andina y amazónica, entre los departamentos de Nariño y Putumayo (Morales et al., 2007). Los puntos de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta las características fisiográficas particulares de cada zona además de las condiciones de seguridad y acceso, teniendo en cuenta los límites jurisdiccionales de Parques Nacionales y los cabildos indígenas. Los sitios seleccionados para este estudio se ubicaron dentro de los páramos de Morasurco, Ovejas y Santa Lucía (Figura 2, Tabla 2).

Tabla 2. Coordenadas y altura sobre el nivel del mar de los puntos muestreados dentro de los páramos seleccionados.

Localidad	Coordenadas	Altura
Morasurco	1°16'14,1"N	3505 m.s.n.m.
	77°14'20,6"W	
Ovejas	1°7'13,6"N	3412 m.s.n.m.
	77°12'47,5"W	
Santa Lucía	1°0'3,80"N	2808 m.s.n.m.
	77°9'37,4"W	

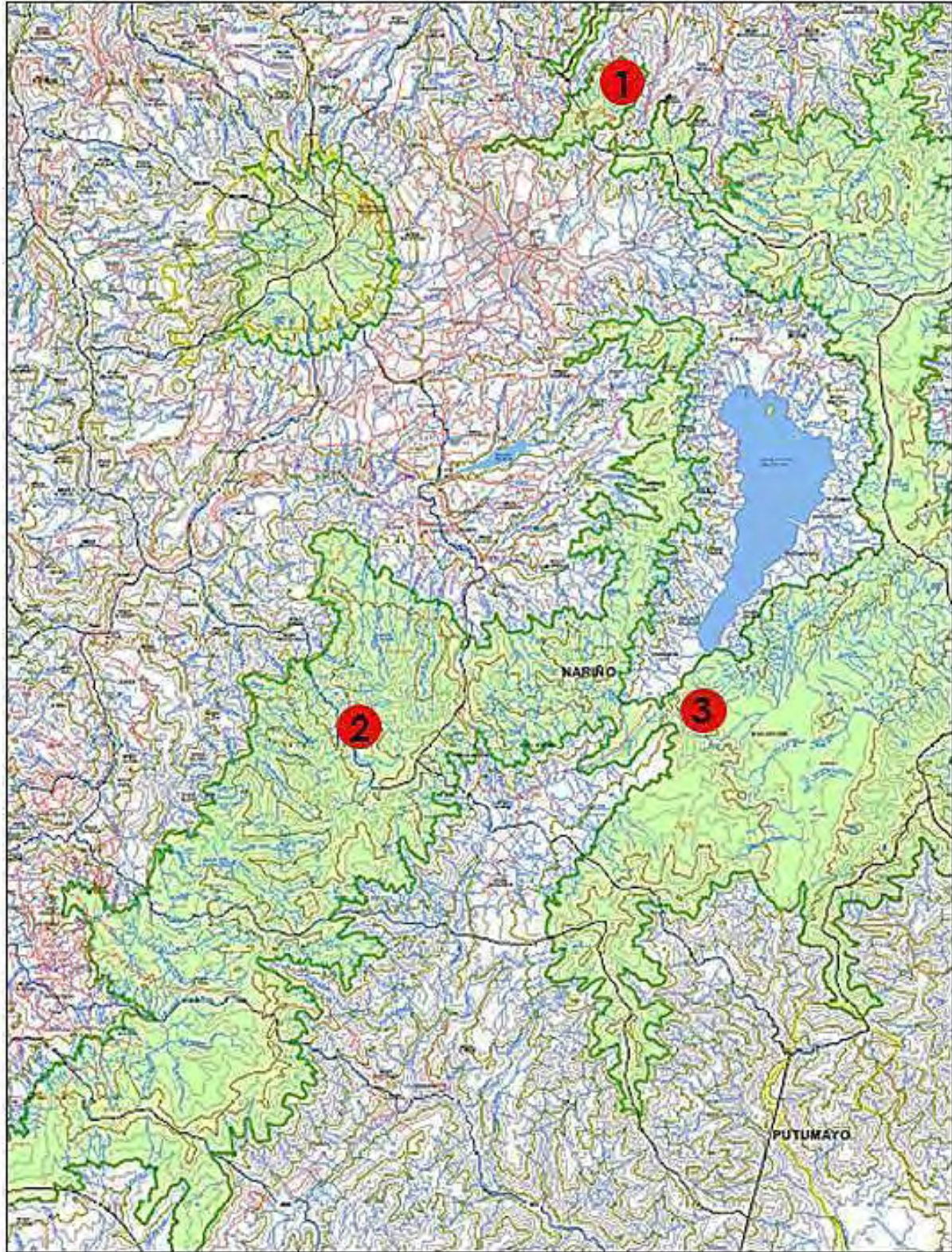


Figura 2. Zonas escogidas para la toma de muestras del complejo de páramos La Cocha - Patascoy. 1: Morasurco, 2: Ovjejas y 3: Santa Lucia **Fuente:** (Solarte et al, 2007)

El páramo de Morasurco (Figura 3) constituye un ecosistema intra-andino asilado totalmente por los efectos de las actividades humanas, la humedad y lluvia son significativamente más bajas que en otros páramos del complejo, constituye un ecosistema de páramos propiamente dicho (Solarte et al., 2007).

El páramo de Ovejas (Figura 4) se localiza hacia el oriente de los andes, se encuentra influenciado por las masas de aire húmedo provenientes de la amazonia, es la zona de páramo más grande de todo el complejo, presenta paramos propiamente dichos por encima de los 3.200 m.s.n.m. y presenta el mejor estado de conservación de todo el complejo (Solarte et al., 2007).

El páramo de Santa Lucia (Figura 5) se encuentra en el sur de la laguna de La Cocha en los fondos planos de los valles de los ríos Estero y Guamués, a una altura promedio de 2700 m.s.n.m y están influenciados por las masas de aire húmedo provenientes de la amazonia, su característica principal es que son azonales (Solarte et al., 2007).



Figura 3. Zona de muestreo Morasurco, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño. **Fuente:** Este estudio.



Figura 4. Zona de muestreo Ovejas, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño. **Fuente:** Este estudio.



Figura 5. Zona de muestreo Santa Lucia, Municipio de Pasto, Departamento de Nariño.
Fuente: Este estudio.

6.2. RECOLECCIÓN DE TEJIDOS VEGETALES.

En total se colectaron 30 muestras de *E. pycnophylla*, para cada páramo se escogieron 10 individuos al azar teniendo en cuenta una separación mínima de 50 m entre cada uno, se seleccionaron tejidos foliares libres de polen, suelo, epifitas, líquenes u hongos y sin señales de daño por herbivoría. Cada muestra fue introducida en bolsa de papel debidamente marcada con un código de colecta, datos de localidad y número de individuo (Figura 6). Para la conservación de estos tejidos se utilizó el protocolo propuesto por Adams y Do (1992).

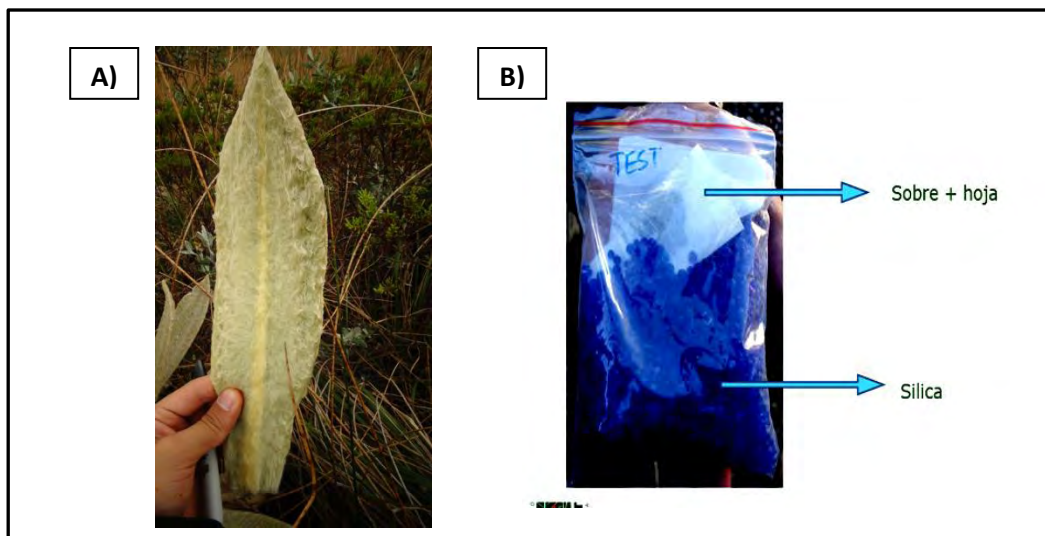


Figura 6.Recolección tejidos vegetales. A) Muestra del tejido vegetal colectado; B) conservación del material vegetal por el método propuesto por Adams y Do (1992). **Fuente:** Este estudio.

6.3. EXTRACCIÓN DE ADN.

Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio de investigación del Grupo en Genética y Evolución de Organismos Tropicales. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo de Griffith y Shaw (1998) optimizado bajo las condiciones de laboratorio por Martínez y Colaboradores en el año 2014.

- Cada muestra de tejido fue cortada en trozos pequeños y macerada en tubos Falcon con nitrógeno líquido hasta su pulverización.
- Se agregaron 800µl de buffer de extracción CTAB (NaCl 1.4M, EDTA pH 8.0 20mM, Tris HCl pH 8.0 100mM, CTAB 2%), 2 µl de proteinasa K (20mg/mL; Thermo Scientific) y se incubó en baño maría (Lt WNB-7, Marca Memmert) durante una hora a 65°C.
- Se adicionaron 600 µl de cloroformo y se mezcló en vortex (S-0200, Marca Labnet) por diez segundos.
- Se centrifugó en microcentrifuga (Z233 M2, Marca Hermle) a 17.000 gravedades por 10 minutos, se tomaron 600µl de la fase superior y se transfirieron a un tubo nuevo.
- Se adicionaron 60µl por cada 100µl del sobrenadante obtenido y se dejó en posición vertical a temperatura ambiente por 5 minutos.
- Se centrifugó a 17.000 gravedades por 10 minutos y se eliminó el sobrenadante.
- El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se dejó en baño maría a 65°C durante 20 minutos.
- Se centrifugó a 17.000 gravedades por diez minutos y se dejó a temperatura ambiente hasta evaporar el etanol.
- El pellet se resuspendió en 100µl de agua grado molecular, se agregaron 3 µl de ARNasa (10 mg/mL, Thermo Scientific) y para la digestión se incubó durante 3 horas a 37°C.

La pureza y concentración del ADN extraído se determinó mediante la cuantificación por espectrofotometría (NanoDrop 2000C) teniendo como parámetros de buena calidad valores entre 1.8 – 2.0 en una relación de absorbancia 260/280 nm (Desjardins y Conklin, 2010).

6.4. Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

6.4.1. Amplificación

A partir de concentraciones de ADN entre 20 y 40 ng se amplificaron primers de las regiones intergénicas de cloroplasto como se relaciona en la tabla 3.

Tabla 3. Lista de primers de regiones intergénicas del genoma de cloroplasto.

Locus	Foward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	TM	Tamaño fragmento	Referencia
trnQ/trnS	trnQ : GGGACGGAAGGATTCGA ACC	trnSr : GGGAGAGATGGCTGAG TGGAC	57 – 59 °C	1303 pb	(Grivet et al., 2001)
trnD/trnTr	trnD : ACCAATTGAACTACAAT CCC	trnTr : CTACCACTCAGTTAAAA GGG	45 – 48 °C	578-1403	(Shaw et al., 2005)
trnS2/trnF M	trnS2 : GAGAGAGAGGGATTCGA ACC	trnF : CATAACCTTGAGGTCAC GGG	51 – 54 °C	1254 pb	(Grivet et al., 2001)
ndhF/rpl32	ndhF : GAAAGGTATKATCCAYG MATATT	rpL32-R : CCAATATCCCTTYTTT TCCAA	47 – 55 °C	729-1254 pb	(Shaw, Lickey, Schilling, y Small, 2007)
trnL/rpl32	trnL(UAG) : CTGCTTCCTAAGAGCAG CGT	rpL32-F : CAGTTCCAAAAAACG TACTTC	50 – 53 °C	543-1417 pb	(Shaw et al., 2007)

Cada mix usado para las amplificaciones fue preparado con las siguientes condiciones: 1X de Buffer Taq con KCl, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.3 mM de cada primer, 1 U de Taq polimerasa en un volumen final de 25 µl ajustado con agua grado molecular (Shaw, Lickey, Schilling, y Small, 2007). Las amplificaciones de estas regiones se llevaron a cabo en un Termociclador (MyGene96 Thermo Block Marca Bionner) programado de la siguiente manera: Desnaturalización inicial (4 min a 94°C), seguido de 30 ciclos de desnaturalización

(45 seg a 92°C), apareamiento (45 seg a 50-63°C) y extensión (3 min a 72°C) y por último una extensión final (10 min a 72°C). En cada PCR se incluyó un control negativo para verificar que no existiera contaminación.

La verificación de los amplificadores se realizó mediante geles de agarosa al 1,4% teñidos con bromuro de etidio, cada pozo del gel se cargó con 5uL del amplificado y 3uL de buffer de carga 2X (DNA Loading Dye, Thermo Scientific), los geles además incluyeron una escalera de tamaño molecular GenRuler 100pb plus marca Thermo Scientific. La visualización de los geles se realizó en un transiluminador (UVP marca DyNA Light™) y se fotografió cada gel con una cámara digital (DSXh-300 Marca SONY.)

6.4.2. Digestión con enzimas de restricción.

A través del software jPCR (Kalendar, Lee y Schulman, Finlandia. 2011) se seleccionaron las regiones intrónicas del cloroplasto propuestas en esta investigación sobre el genoma de *Arabidopsis thaliana*. Estas secuencias fueron procesadas en el programa pDRAW32 V 1.1.131 (AcaClone) con el fin de evaluar los polimorfismos generados por las enzimas: EcoRI, MboII, HindIII, TaqI, HaeIII y MseI seleccionadas por revisión de literatura (Azpilicueta et al., 2009; Palacio-Mejía, 2005; Schlogl, de Souza, y Nodari, 2007) (Tabla 4).

Tabla 4. Descripción de las enzimas de restricción evaluadas *in silico*.

Enzima de restricción	Secuencia	Corte
EcoRI	5': GAATTC 3': CTTAAG	5'----G AATTC----3' 3'----CTTAA G----5'
HindIII	5'AAGCTT 3'TTCGAA	5'---A AGCTT---3' 3'---TTCGA A---5'
MboII	5'... G A A G A (N) 8 ↓ ...3' 3'... C T T C T (N) 7 ↑ ...5'	5'----GAAGANNNNNNNNN 3' 3'----CTTCTNNNNNNNN --5'
TaqI	5': TCGA 3': AGCT	5'----T GCA----3' 3'----ACG T----5'
HaeIII	5': GGCC 3': CCGG	5'----GG CC----3' 3'----CC GG----5'
MseI	5': TTAA 3': AATT	5'----T TAA----3' 3'----AAT T----5'

Las enzimas seleccionadas para realizar la digestión fueron EcoRI, MboII y HindIII. El volumen final del mix de digestión fue de 15 μ L y preparado según las condiciones sugeridas por el fabricante de cada enzima, estos se incubaron por 3 horas a 37°C y 15 minutos a 65°C en un Termociclador (MyGene96 Thermo Block Marca Bionner). Los fragmentos digeridos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio, cada pozo fue cargado con 6 μ L del producto de digestión más 4 μ L de buffer de carga 2X y una escalera de tamaño molecular GenRuler 100pb plus marca Fermentas para su visualización.

6.5. ANÁLISIS DE DATOS

El tamaño de los fragmentos se determinó a través del programa PhtocaptMw Version 10,01 (Viller-Lourmat, Francia.2010), con los datos generados por la digestión de cada enzima se construyeron tablas de contingencia en el programa Excel (Microsoft Excel, Silycon Valley, USA 2010). Se realizó un análisis AMOVA el cual es utilizado para determinar la varianza total existente entre individuos dentro de poblaciones y entre las poblaciones, usando 10.000 permutaciones (Eguiarte, Aguirre-planter, Scheinvar, y González, 2010; Excoffier, Smouse, y Quattro, 1992) Estos análisis se realizaron en el programa Arlequín versión 3.5 (Excoffier, L y Lischer, H. 2010).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. EXTRACCIÓN DE ADN

El protocolo de extracción propuesto por Griffith y Shaw (1998) optimizado bajo las condiciones de laboratorio por Martínez y Colaboradores (2014), permito la obtención de ADN a partir de las muestras de tejido vegetal. Este fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,9% (Figura 7) y cuantificado por espectrofotometría (NanoDrop 2000C) (Tabla 5). Obteniendo como resultados un ADN de buena calidad y con los parámetros de concentración y pureza recomendados por Desjardin y Conklin (2010).

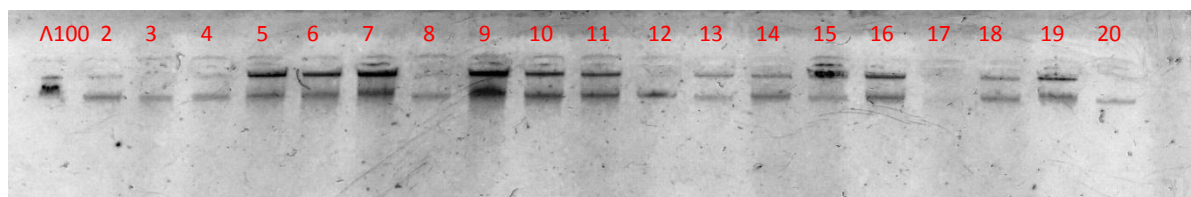


Figura 7. Extracción de ADN de *E. pycnohpylla*. Santa lucia Pozo (Pz) 2: Indv 10, Pz3: Indv 4; Pz4: Indv 3; Pz5: Indv 2; Pz6: Indv 7; Pz7: Indv 6; OvejasPz8: Indv 14; Pz9: Indv 16; Pz10: Indv 13; Pz11: Indv 17; Morasurco Pz12: Indv 22; Pz13: Indv 26; Pz14: Indv25; Pz15: Indv 23; Pz16: Indv 24; Pz18: Indv 28; Pz19: Indv 27; Pz20: Indv 30. Fuente. Este estudio

Tabla 5. Cuantificación por espectrofotometría en Nanodroop 2000C.

Individuo	Localidad	Concentración (ng/uL)	A 260/280	Individuo	Localidad	Concentración (ng/uL)	A 260/280
1	Santa Lucia	172	1,84	16	Ovejas	191	1,82
2	Santa Lucia	134	1,81	17	Ovejas	128	1,87
3	Santa Lucia	75	1,78	18	Ovejas	146	1,83
4	Santa Lucia	62	1,79	19	Ovejas	168	1,83
5	Santa Lucia	204	1,81	20	Ovejas	253	1,89
6	Santa Lucia	178	1,84	21	Morasurco	192	1,9
7	Santa Lucia	122	1,84	22	Morasurco	115	1,9
8	Santa Lucia	107	1,84	23	Morasurco	117	1,82
9	Santa Lucia	227	1,8	24	Morasurco	141	1,81
10	Santa Lucia	105	1,87	25	Morasurco	85	1,81
11	Ovejas	156	1,85	26	Morasurco	110	1,83
12	Ovejas	137	1,89	27	Morasurco	186	1,88
13	Ovejas	174	1,85	28	Morasurco	157	1,88
14	Ovejas	75	1,79	29	Morasurco	201	1,85
15	Ovejas	154	1,79	30	Morasurco	96	1,86

7.2. Amplificación de las regiones intergenicas de ADN de cloroplasto

Con la aplicación del protocolo descrito en la metodología (Shaw et al., 2007), no se logró la amplificación de las regiones propuestas y, considerando que la temperatura de alineamiento (T_m) depende de la longitud y secuencia de los primers además de que es específica para cada uno de ellos por cuanto si es muy baja la unión será de forma inespecífica y si es muy alta no se producirá alineamiento completo, se realizó una prueba con gradiente de temperatura como se relaciona en la tabla 6.

Tabla 6. Gradiente de temperatura para la amplificación de las regiones intergénicas

Región intergénica	Temperatura reportada	Gradiente de temperatura probado	Temperatura optima de alineamiento
trnQ/trnS	57 – 59 °C	55 – 65 °C	62 °C
trnD/trnTr	45 – 48 °C	44 – 54 °C	---
trnS2/trnFM	51 – 54 °C	47 – 57 °C	---
ndhF/rpl32	47 – 55 °C	47 – 57 °C	50°C
trnL(UAG)/rpl32	50 – 53 °C	47 – 57 °C	52 °C

Para las regiones que no amplificaron trnD y trnS2 no se consideraron otras variables del protocolo que pudiesen haber afectado el proceso de amplificación por cuanto se encontraban dentro de los parámetros adecuados para obtener una amplificación positiva según lo reportado Shaw y colaboradores (2007). No obstante es importante retomar el proceso de optimización ya que como lo menciona Espinosa (2007) existen factores que pueden afectar la amplificación como:

- Concentración de iones de magnesio, altas concentraciones inhiben la acción de la polimerasa y bajas concentraciones pueden generar productos inespecíficos.
- Concentración de nucleótidos, incrementos en las concentraciones inhiben la reacción porque capturan el magnesio necesario para que la polimerasa trabaje.

- Cofactores, estos ayudan a la reacción como es el caso de BSA (Bovine Serum Albumin) que a concentraciones por encima de 0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ incrementa la eficiencia de la PCR, ya que actúa como una proteína captadora de iones y otros inhibidores de la taq polimerasa como es el caso de los pigmentos (Espinosa, 2007).

En diferentes trabajos sobre variabilidad genética en plantas (Azpilicueta et al., 2009; Besnard et al., 2002; Collada et al., 2001; Ge, Liu, Wang, Schaal, y Chiang, 2005; Marchelli y Gallo, 2006; Mohanty, Martín, y Aguinagalde, 2002; Pock Tsy et al., 2009; Van Droogenbroeck et al., 2004; Vekemans, Hardy, y Berken, 1998) (Anexo 1) analizan variabilidad genética con menos de cinco regiones intergenicas del ADN de cloroplasto puesto que en sus estudios obtienen polimorfismos con enzimas de restricción que les permiten analizar e inferir variabilidad genética en estudios poblacionales. Razón por la cual se prosiguió con las siguientes etapas metodológicas propuestas, De esta manera los tamaños de las tres regiones amplificadas trnL(UAG) + rpl32 (965pb), ndhF + rpl32 (1100 pb) y trnQ + trnSr (1260pb) (Figura 8) concuerdan con los resultados reportados por Grivet y colaboradores en el 2001.

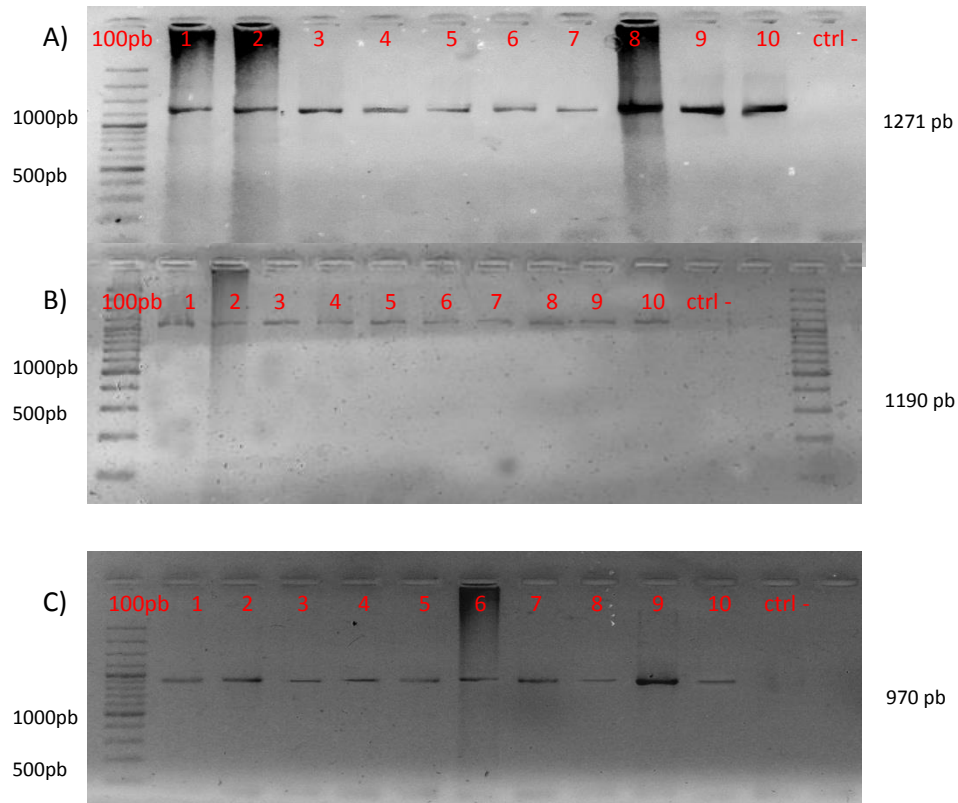


Figura 8. Fotografías de geles de Agarosa teñidos con bromuro de Etidio y visualizados en un transiluminador. A) Región amplificada trnQ (1271pb); B) Región amplificada ndhF (1190pb); C) Región amplificada trnL (UAG) (970pb). **Fuente.** Este estudio.

7.3. Digestión de las regiones intergenicas amplificadas

Los resultados de la prueba *in silico* (Anexo 2) permitieron seleccionar a las enzimas EcoR, HindIII, MboII y MseI puesto que presentaron cortes en las tres regiones intergénicas estudiadas (Tabla 7), sin embargo se descartó la enzima MseI debido a que el tamaño de los fragmentos generados dificultaría su observación e identificación en geles de agarosa.

Tabla 7. Polimorfismos generados *in silico* con la técnica PCR-RFLP.

	trnQ (1250pb)		ndhF (927)		trnL(UAG) (861pb)	
	No. Frag.	Tamaño Frag	No. Frag.	Tamaño Frag	No. Frag.	Tamaño Frag
EcoRI	2	1016pb;234pb	3	564pb;243pb;120pb	3	439pb;236pb;186pb
HaeIII	2	746pb;504pb	0	0	0	0
HindIII	2	768pb;482pb	2	574pb;353pb	2	758pb;103pb
MboII	3	552pb;440pb;258pb; 253pb;185pb;162pb;	2	635pb; 292pb 240pb;140pb;106pb;	3	452pb;275pb;134pb 205pb;166pb;135pb;
MseI	13	157pb;128pb;97pb; 86pb;66pb;57pb; 21pb;18pb;11pb;9pb	11	94pb;85pb;64pb; 62pb;60pb;38pb; 32pb;6pb	12	110pb;70pb;65pb; 42pb;21pb;20pb; 11pb;9pb;7pb
TaqI	6	565pb;282pb;259pb; 76pb;63pb;5pb	0	0	5	525pb; 127pb;86pb; 78pb;45pb

Al realizar la digestión con las enzimas de restricción EcoRI, HindIII y MboII, se obtuvo un total de 25 bandas polimórficas, siendo la enzima MboII la que mayor polimorfismo generó con 14 bandas, seguida de EcoR con 9 y HindIII con 2. Además se pudieron identificar para todas las regiones intergénicas 11 patrones de restricción, de los cuales 4 corresponden a la región trnQ, 4 a la región ndhF y 3 para la región trnL (Figura 9,10 y 11). Con las tablas de contingencia se determinaron haplotipos en cada región génica estudiada a partir de los patrones de restricción obtenidos sobre las mismas (Tabla 8).

Tabla 8. Haplotipos presentes en las regiones intergénicas estudiadas.

trnQ				ndhF				trnL(UAG)			
Pob	Morasurco	Ovejas	Santa Lucia	Pob	Morasurco	Ovejas	Santa Lucia	Pob	Morasurco	Ovejas	Santa Lucia
Hapl				Hapl				Hapl			
HQ1	1	4	0	HN1	1	0	0	HL 1	4	4	2
HQ2	0	1	0	HN2	1	0	0	HL 2	2	1	2
HQ3	5	4	4	HN3	3	2	2				
HQ4	1	0	0	HN4	2	0	0				
HQ5	2	0	3	HN5	0	3	2				
HQ6	0	0	3	HN6	0	0	1				
				HN7	1	0	0				
				HN8	1	2	4				
				HN9	1	0	0				

Pob: población. **Hapl:** haplotipos. **HQ:** haplotipos generados por la región trnQ. **HN:** haplotipos generados por la región ndhF. **HL:** haplotipos generados por la región trnL (UAG).

Región intergénica trnQ

Santa Lucia

Ovejas

Morasurco

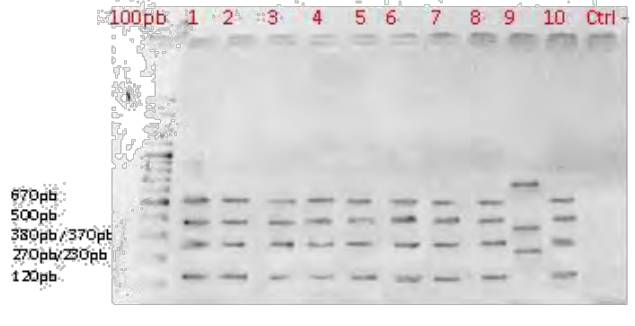
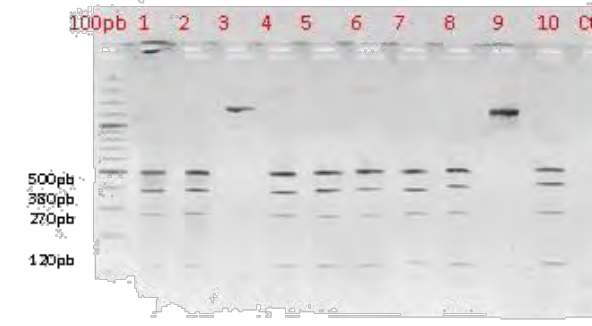
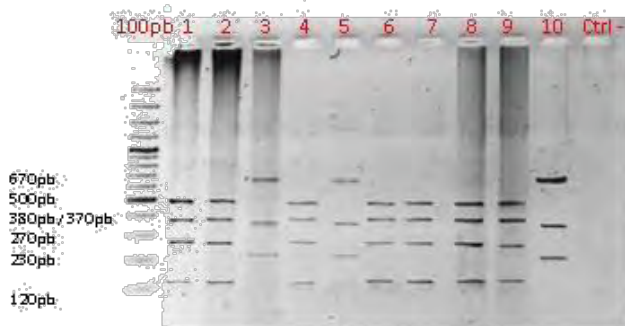
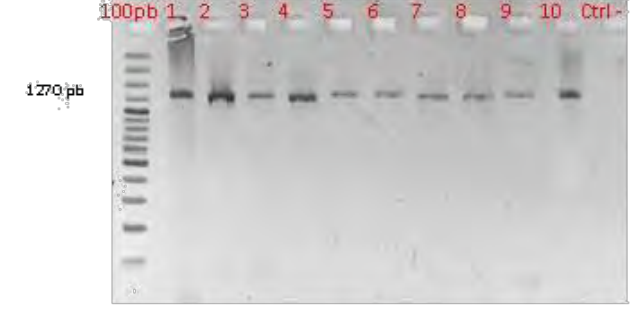
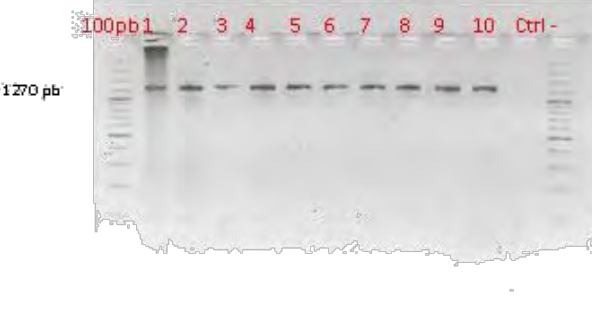
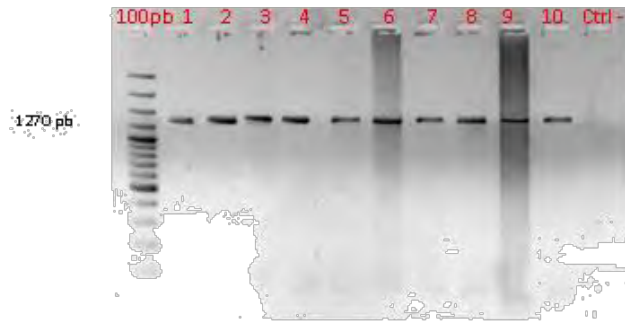
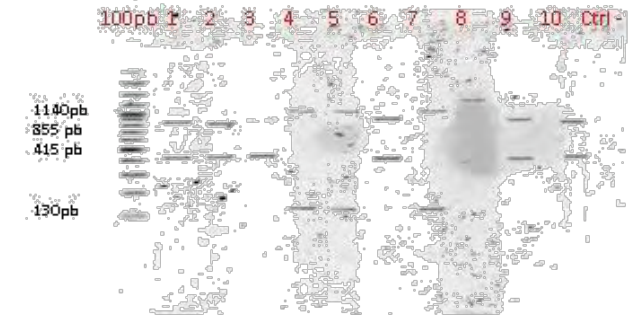
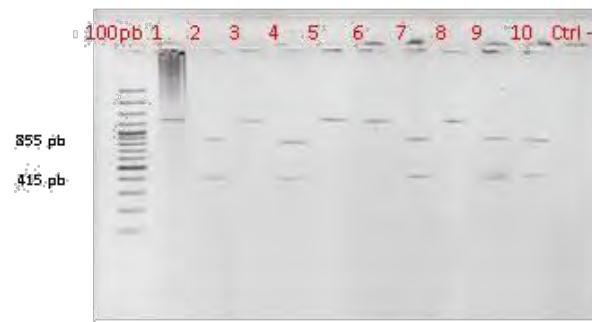


Figura 9. Patrones de bandeo de la región trnQ: A) Muestras de Santa Lucia con enzima EcoRI; B) Muestras de Ovejas con enzima EcoRI; C) Muestras de Morasurco con enzima EcoRI; D) Muestras de Santa Lucia con enzima HindIII; E) Muestras de Ovejas con enzima HindIII; F) Muestras de Morasurco con enzima HindIII; G) Muestras de Santa Lucia con enzima MboII; H) Muestras de Ovejas con enzima MboII; I) Muestras de Morasurco con enzima MboII. **Fuente.** Este estudio

Región intergénica ndhF

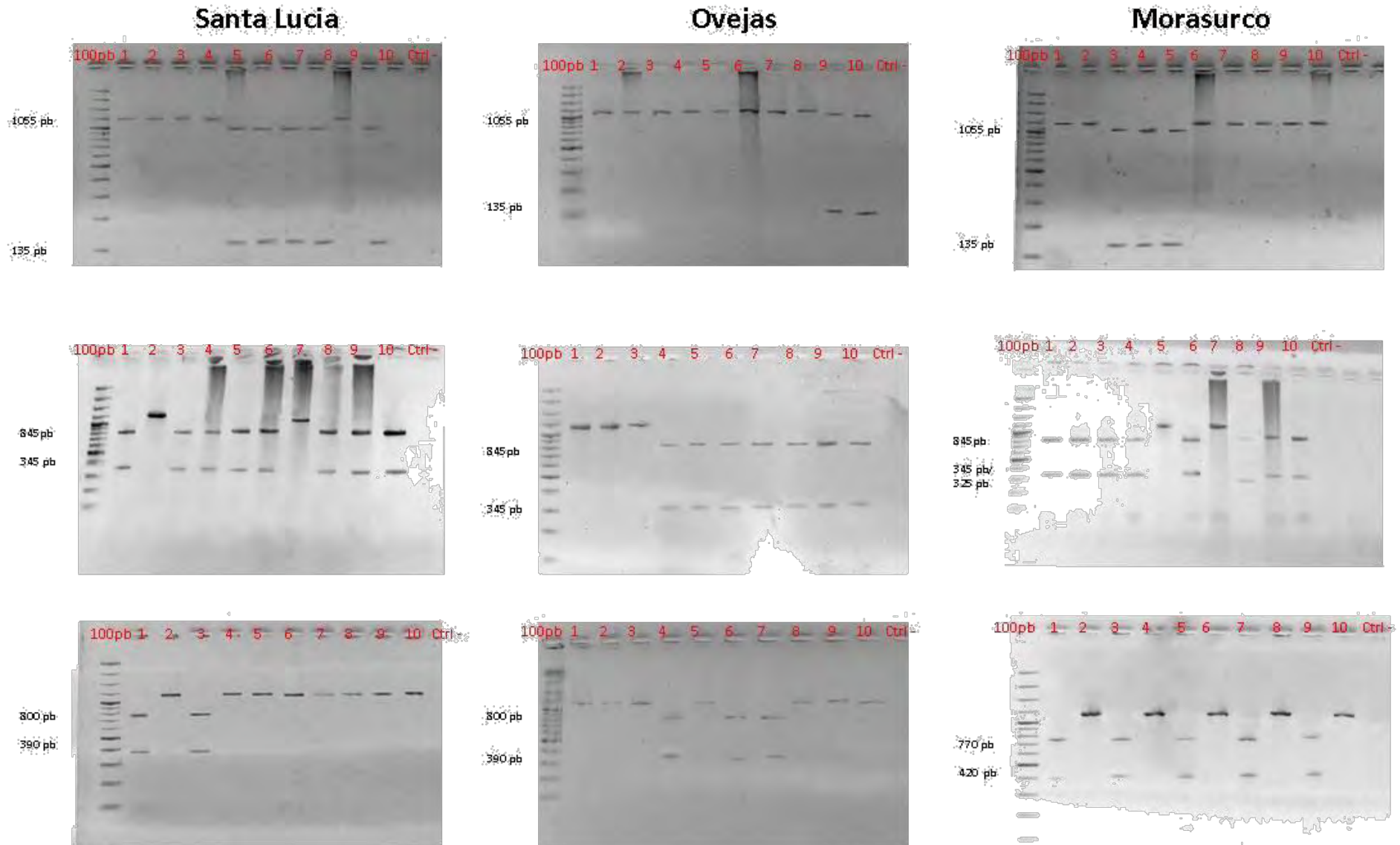
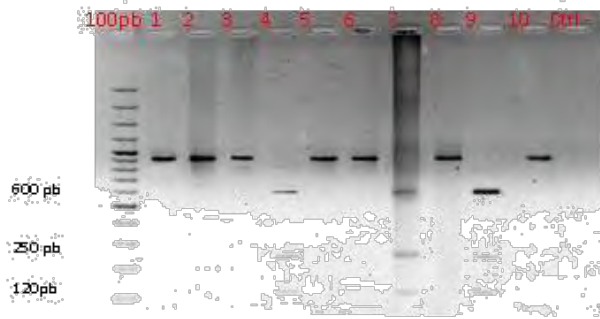


Figura 10. Patrones de bandeo de la región ndhF: A) Muestras de Santa Lucia con enzima EcoRI; B) Muestras de Ovejas con enzima EcoRI; C) Muestras de Morasurco con enzima EcoRI; D) Muestras de Santa Lucia con enzima HindIII; E) Muestras de Ovejas con enzima HindIII; F) Muestras de Morasurco con enzima HindIII; G) Muestras de Santa Lucia con enzima MboII; H) Muestras de Ovejas con enzima MboII; C) Muestras de Morasurco con enzima MboII. **Fuente.** Este estudio

Región intergénica trnL(UAG)

Santa Lucía



Ovejas



Morasurco

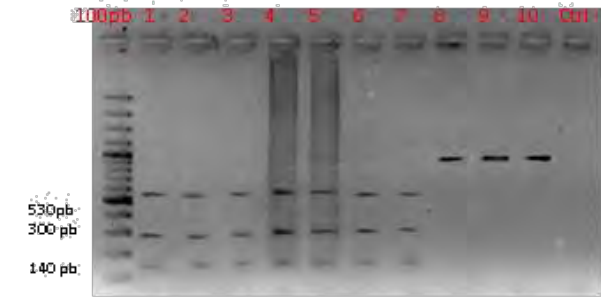
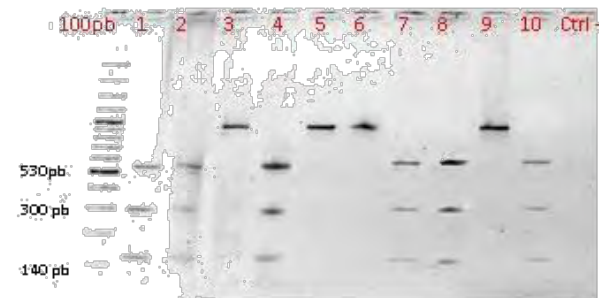
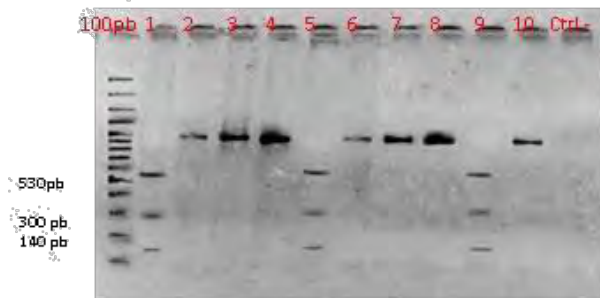
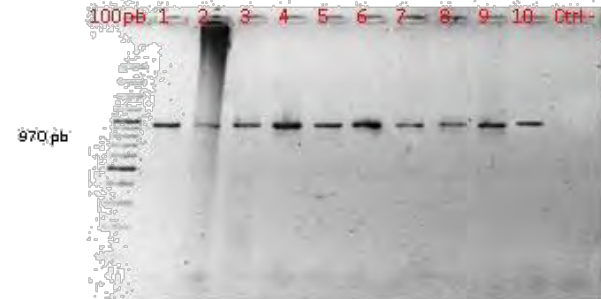
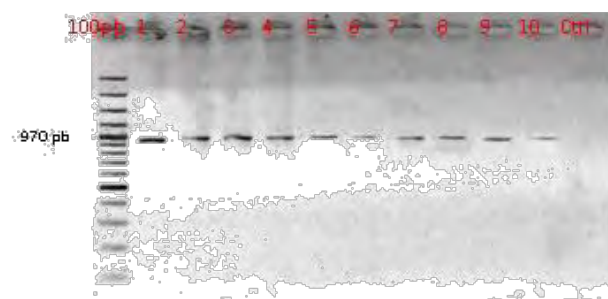
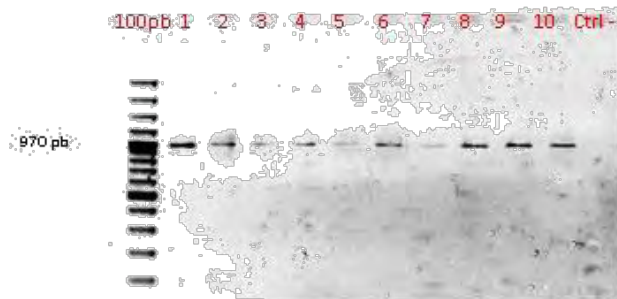
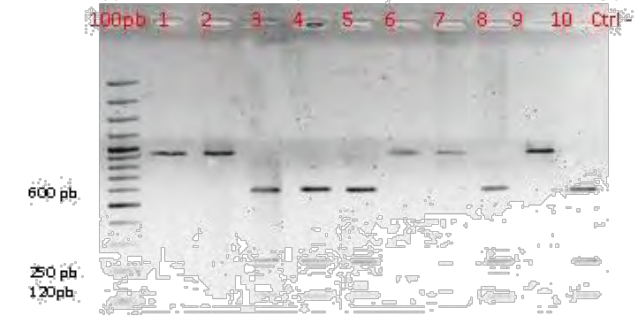


Figura 11. Patrones de bandeo de la región trnL(UAG): A) Muestras de Santa Lucía con enzima EcoRI; B) Muestras de Ovejas con enzima EcoRI; C) Muestras de Morasurco con enzima EcoRI; D) Muestras de Santa Lucía con enzima HindIII; E) Muestras de Ovejas con enzima HindIII; F) Muestras de Morasurco con enzima HindIII; G) Muestras de Santa Lucía con enzima MboII; H) Muestras de Ovejas con enzima MboII; I) Muestras de Morasurco con enzima MboII. **Fuente.** Este estudio

7.4. ANÁLISIS DE DATOS

Con los resultados anteriores se realizó la determinación de la variabilidad genética a través de estadístico AMOVA (Tabla 8). Con las tres regiones intergénicas se obtuvo resultados similares, altos porcentajes en la variación genética dentro de las poblaciones, siendo la región *ndhF* la que presentó el porcentaje más bajo (93.04%) y baja variabilidad entre las poblaciones.

Tabla 9. Resumen del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las tres regiones intergénicas de ADNcp de *E.pycnophylla*.

trnQ			
Tipo de variación	%Total	Fst	P
Entre las poblaciones	8,25	0,082	0,18
Dentro de poblaciones	91,75		
ndhF			
Tipo de variación	%Total	Fst	P
Entre las poblaciones	-6.47	-0,064	0,72
Dentro de poblaciones	106.47		
trnL(UAG)			
Tipo de variación	%Total	Fst	P
Entre las poblaciones	-14,30	-0,14	0,79
Dentro de poblaciones	114,30		

%Total: Porcentaje total de la varianza contribuida por cada componente; **Fst:** Índice de fijación; **P:** p-value

La baja variabilidad entre poblaciones puede relacionarse con la hipótesis del origen del páramo y se apoya en registros polínicos y paleobotánicos que indican que los miembros del complejo Espeletiinae han estado ligados a la franja de páramos desde que comenzó su formación, muy probablemente en la época de mayor expansión del páramo hace 15.000 años. Durante la fase más fría y seca de este período glacial, la vegetación de páramo cubrió la mayoría de los lugares por encima de los 2.000 msnm y las regiones paramunas que antes se encontraban aisladas quedaron unidas como por ejemplo la cordillera de Mérida en Venezuela con la cordillera Oriental y la Central de Colombia hasta el Ecuador (Otero et al., 2001).

Así mismo, tuvo lugar al mayor intercambio florístico entre especies que se encontraban en áreas boscosas con la zona de páramo y entre especies de las grandes islas paramunas (Fernández-alonso, 2003). Razón por la cual, los miembros de este complejo migraron de manera exitosa logrando el desplazamiento de algunos de sus representantes desde la cordillera de Mérida en Venezuela hasta colonizar las áreas del sur ubicadas en el Ecuador (Figura 12) (Hooghiemstra, Wijninga, y Cleef, 2006; Monasterio y Sarmiento, 1991). Presumiblemente esto es un indicio de que el flujo genético que se dio durante esas migraciones se ha conservado hasta la actualidad a pesar de no encontrar un área de páramos tan extensa como en aquel periodo.

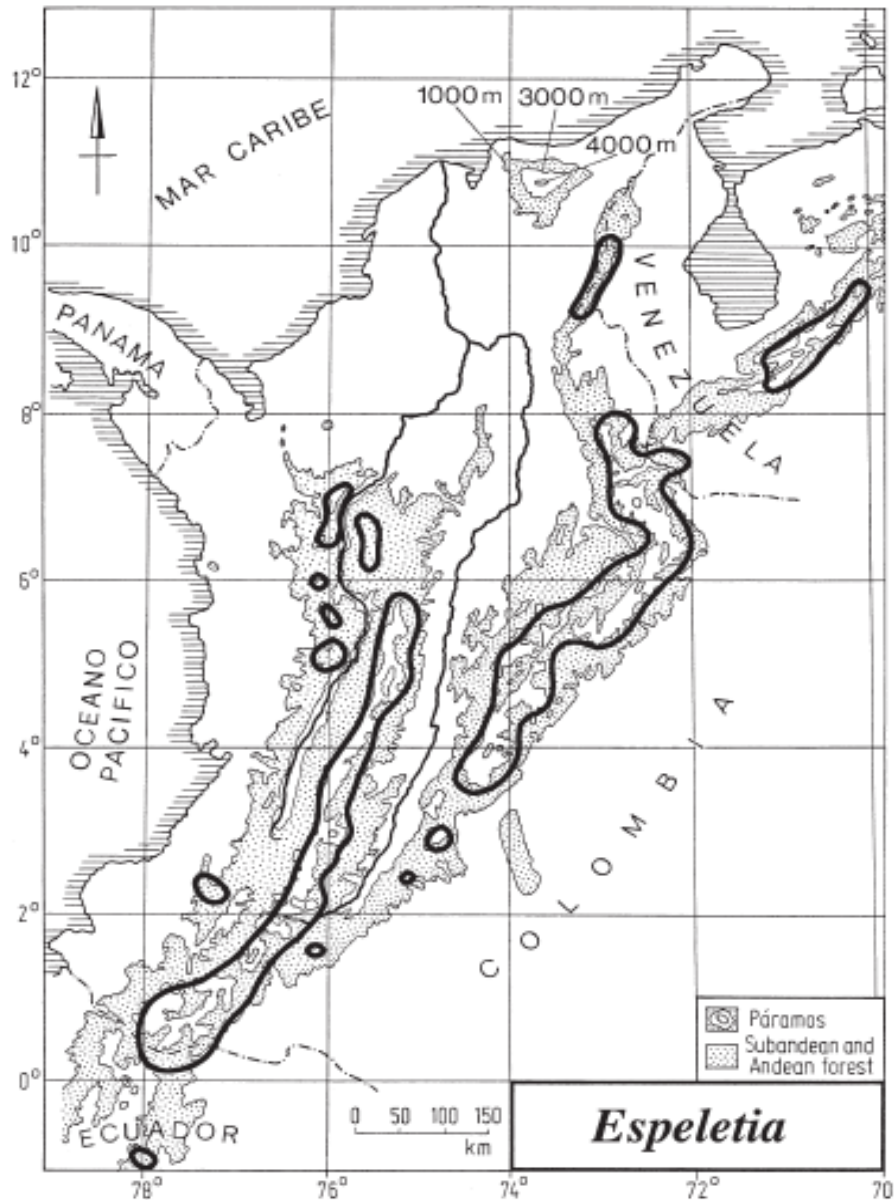


Figura 12. Mapa de distribución del genero *Espeletia* cuya área de distribución coincide con la formación geológica de los andes **Fuente:** (Hooghiemstra et al., 2006)

Una estrategia que permite conservar el flujo genético en este tipo de poblaciones, son las relaciones interespecificas que el género *Espeletia* presenta, según Fagua y Bonilla (2005) al estudiar la ecología de la polinización de *Espeletia grandiflora* en el parque natural Chingaza, encontraron diferentes tipos de fauna asociadas a los capítulos de esta especie (Figura 13), los cuales fueron divididos en dos grandes grupos: Residentes y Visitantes, que a su vez se subdividen en predadores, saprófagos y herbívoros, siendo estos últimos los

polinizadores directos de esta especie de *Espeletia* y que contribuyen a mantener el flujo genético entre poblaciones.

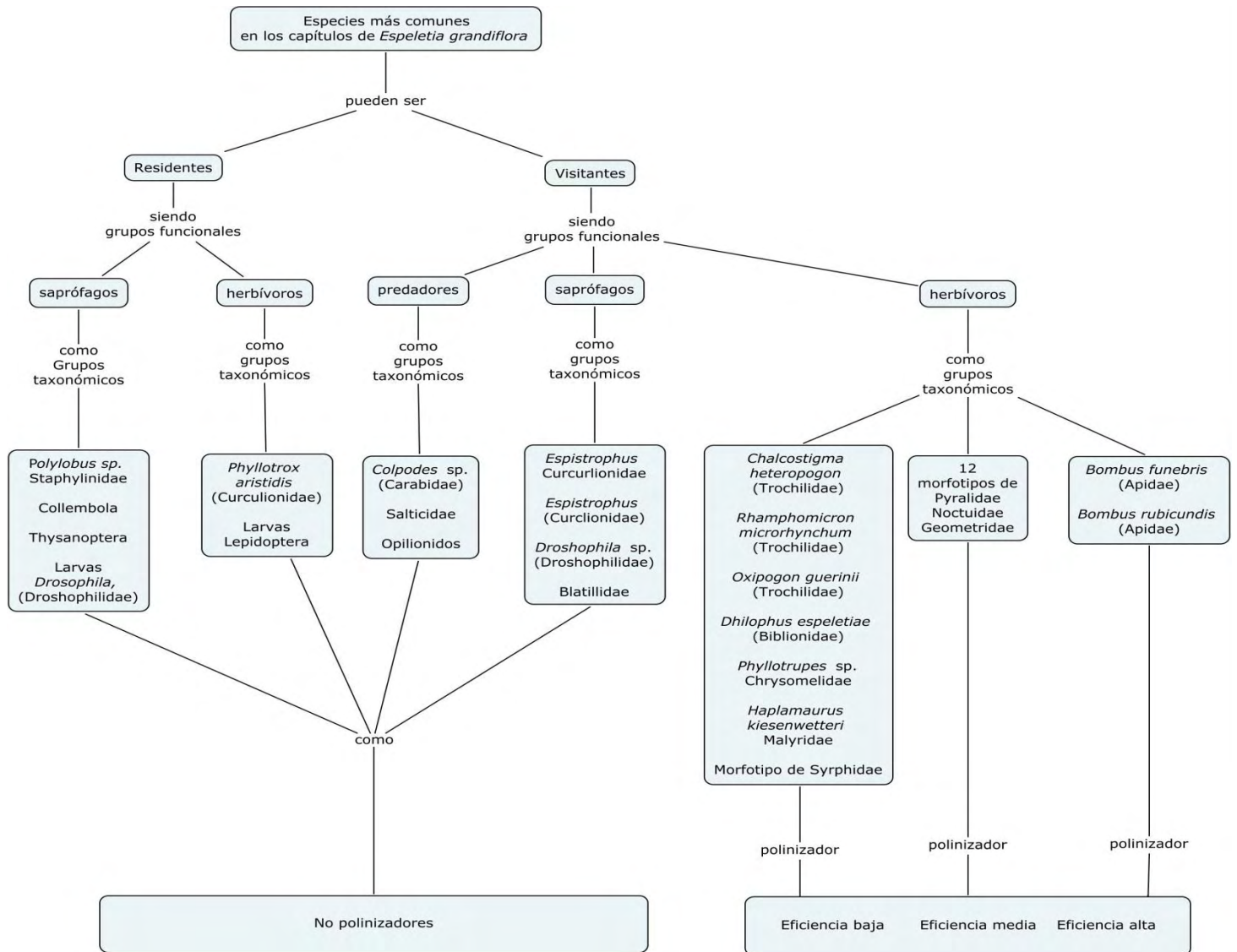


Figura 13. Especies polinizadoras comunes en *E. grandiflora*. **Fuente.** Fagua y Bonilla (2005).

Específicamente para *E. pycnophylla* se ha reportado a representantes de la familia Trochilidae como polinizadores de eficiencia baja. Un ejemplo de esta relación es la que presenta con el colibrí *Chalcostigma herrani*, que Gutiérrez y colaboradores (2004), lo

reportan como polinizador directo de *E. pycnophylla* al encontrar registros de polen en su pico y gula, esta especie es abundante en los ecosistemas de páramo y subpáramo con distribución en los andes del norte desde Perú hasta Colombia por encima de los 3.000 msnm.

Otras especies de colibríes que pueden estar manteniendo este flujo genético son *Patagona gigas* y *Oreotrochilus Chimborazo*, cuya movilidad se registra en áreas de 60 km y 70 km respectivamente y que si bien su principal fuente recurso alimenticio son las inflorescencias de las puyas (*Puya sp.*) y de los vicundos (*Bromelia sp.*), ocasionalmente se alimentan de las flores de *Espeltia* cuando sus recursos principales escasean (Woods, Ortiz-Crespo, y Ramsay, 1998).

Para otro tipo de polinizadores específicos de *E. pycnophylla* no se encontraron referencias bibliográficas que los describan. Sin embargo en observaciones *in situ* del presente trabajo se observó a representantes del género *Bombus* en visitas activas sobre los individuos muestreados (Figura 14), situación que plantea la posibilidad de la realización de estudios a futuro enfocados en los vectores directos y de alta eficiencia en polinización que ayuden a mantener el flujo genético en esta especie.



Figura 14. Observación *in situ* de representantes del género *Bombus* en visitas activas sobre *E. pycnophylla*. **Fuente.** Este estudio

Por otro lado, los resultados muestran que se presentan una alta variabilidad dentro de la población estudiada en el complejo La Cocha - Patascoy. Según la teoría clásica de la biología de la conservación, las poblaciones de especies endémicas generalmente se encuentran aisladas y con pocos individuos, situación que conlleva a una disminución de la diversidad genética y la viabilidad de las poblaciones por acción de la deriva génica, la endogamia y la ausencia de flujo de polen y semillas (Miranda-Esquivel, Rangel, y Roa-Fuentes, 2001). No obstante, al analizar las tres regiones intergenicas del genoma de cloroplasto de *E. pycnophylla* este patrón biológico no se observa en este complejo paramuno, permitiendo sugerir que el flujo genético se mantiene.

Los resultados de este estudio concuerdan con lo reportado por Mohanty, Martín y Aguinalalde (2002), quienes estudiaron poblaciones Europeas de *Prunus spinosa* una especie muy común en Europa, con un patrón biogeográfico de distribución fragmentado y haciendo uso de la misma técnica de PCR-RFLP con seis regiones conservadas del ADN de cloroplasto, encontraron alta variabilidad dentro de las poblaciones ($F_{st}=0,33$; Variación entre poblaciones (VEP):27%; Variación dentro de poblaciones (VDP):78%). Ellos atribuyen estos resultados a la eficiencia de la dispersión de semillas a larga distancia que presenta esta especie, con lo cual mantienen el flujo genético entre poblaciones que se encuentran aisladas hasta 50km de distancia y así, disminuye la heterogeneidad genética entre las poblaciones.

Es posible que la dispersión de semillas por parte de *E. pycnophylla* esté manteniendo el flujo génico dentro de la población estudiada, ya que como lo menciona Maya y Gomes (2016) al estudiar la dispersión de semillas en *Espeletia uribei*, esta presenta dos tipos de dispersión, una primaria denominada Barocora y una dispersión secundaria (horizontal) donde el viento o la escorrentía mueven las semillas a una mayor distancia de los adultos reproductivos, esta juega un papel importante en la distribución de *Espeletia*, al permitir la germinación y el establecimiento de las semillas en sectores alejados, con buenas condiciones, generado la colonización de nuevos lugares (Vargas, Pérez, Insuasty, Melgarejo, y Rodríguez, 2014).

Gonzales y colaboradores (2009) en el estudio llevado a cabo en los páramos Cerro Negro e Infiernillo en Nariño reportan la autoincompatibilidad de *E. pycnophylla* como estrategia para mantener la variabilidad genética dentro de las poblaciones. La autoincompatibilidad es definida como la inhabilidad de una planta hermafrodita para producir un cigoto luego de la auto-polinización, por lo tanto, constituye un mecanismo genético que evita la auto-fertilización en las plantas. De esta manera la especie conserva su variabilidad genética y reduce las posibilidades de endogamia al promover la polinización cruzada la cual es muy eficiente en *E. pycnophylla*, de esta manera asegura su éxito evolutivo.

El análisis basado en PCR-RFLP es una técnica muy utilizada para la genotipificación aplicable a diversos taxones, esto se valida con la cantidad de resultados obtenidos en páginas especializadas como NCBI que arrojan más de 15.000 resultados haciendo uso de palabras clave “PCR” y “RFLP”. Para plantas en particular, son muchos los estudios que hacen uso de esta técnica debido a las ventajas que presenta como su bajo costo, fácil implementación en el laboratorio, no requerir de equipos sofisticados y la posibilidad de diseñar primers y verificar sitios de restricción se los puede realizar en software de acceso público. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que esta técnica dificulta la identificación de la variación puntual en el evento en el que multiples SNPs afecten el mismo sitio de reconocimiento de la enzima y no permite realizar un análisis simultaneo de un gran número de SNPs diferentes porque requiere de un par de primers y enzimas de restricción específicas para cada uno de ellos (Rasmussen, 2012).

Es importante tener en cuenta que el conocimiento de la variación genética dentro y entre las poblaciones de especies endémicas juega un papel muy importante en la formulación de estrategias apropiadas para su manejo y conservación. El análisis molecular de las tres regiones intergénicas del ADN de cloroplastos de *E. pycnophylla* permite inferir altos niveles de variabilidad dentro de la población debido probablemente a la existencia de flujo genético gracias a estrategias como la dispersión por semillas y mecanismos de polinización. Al considerar el alto nivel de diferenciación en la población esta debe ser protegida *in situ*. La preocupación principal está en que las actividades como la minería, ganado y agricultura entre otras, cada día invaden los ecosistemas de alta montaña alterando el flujo genético de la población. El establecimiento de áreas protegidas alrededor de estas poblaciones podría ser la mejor opción para conservar los recursos genéticos de la especie (Loo, 2011).

CONCLUSIONES

La baja variabilidad encontrada entre las poblaciones propuestas mediante el análisis de tres regiones intergénicas del ADN de cloroplasto en *E. pycnophylla* permite plantear la existencia de una sola población en el complejo de páramos La Cocha – Patascoy.

El análisis de las tres regiones intergénicas del ADN de cloroplasto en *E. pycnophylla* muestran alta variabilidad dentro de la población del complejo de páramos La Cocha – Patascoy .

RECOMENDACIONES

Optimizar las condiciones de amplificación de las regiones trnD y trnS2 para reafirmar la consistencia de los resultados obtenidos con las tres regiones intergénicas estudiadas.

Para incrementar la robustez de los resultados es pertinente realizar la secuenciación de los amplificadores obtenidos.

Incrementar las zonas de muestreo incluyendo zonas de muestreo de los complejos de páramos Doña Juana y Chiles – Cumbal.

Complementar el trabajo con estudios de otras regiones del genoma de *E. pycnophylla* así como la utilización de marcadores fenotípicos, estudios de polinización y biología reproductiva.

LITERATURA CITADA

- Adams, R. P., y Do, N. (1992). Preservation of dna in plant specimens from tropical species by desiccation. *Conservation of Plant Genes: DNA Banking and in Vitro Biotechnology*, 135–152.
- Agarwal, M., Shrivastava, N., y Padh, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*, 27(4), 617–631.
- Allendorf, F., Luikart, G., y Sally, N. (Eds.). (2013). *Conservation and the genetics of populations*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- Armero, S. (2004). *Efecto de la quema sobre algunos aspectos poblacionales de Espeletia pycnophylla Cautrec. en el páramo el infiernillo (Mallama-Nariño)*. Universidad de Nariño.
- Azofeifa-Delgado, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas ; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17(2), 221–241.
- Azpilicueta, M. M., Marchelli, P., y Gallo, L. A. (2009). The effects of quaternary glaciations in patagonia as evidenced by chloroplast dna phylogeography of southern beech *nothofagus obliqua*. *Tree Genetics and Genomes*, 5(4), 561–571.
- Bedoya, P., y Morillo, M. (2001). *Evaluacion de la trasnpiracion de Espletia pycnophylla durante las epocas humeda y seca en la zona de páramos del santuario de flora y fauna Galeras*. Universidad de Nariño.
- Benavides, F., Burbano, J., Burbano, D., Prieto, R., & Torres, C. (2010). Inferring possible population divergence in *Espeletia pycnophylla* (Asteraceae) through morphometric and paleogeographic approaches. *Revista de Biología Tropical*, 58(4), 1261–1270.
- Besnard, G., Khadari, B., Baradat, P., y Bervillé, A. (2002). *Olea europaea* (Oleaceae) phylogeography based on chloroplast DNA polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(8), 1353–1361.
- Bock, R. (Ed.). (2007). *Cell and Molecular Biology of Plastids. Cell and Molecular Biology of Plastids* (Vol. 19). Goteborg. Recuperado de <http://link.springer.com/10.1007/978-3-540-75376-6>
- Cabrera, M., y Ramírez, W. (Eds.). (2014). *Restauración ecológica de los páramos de colombia: Transformación y herramientas para su conservación*. Bogota: Instituto de

Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).

- Cavellier, J., Machado, J., Valencia, D., Montoya, J., Hurtado, A., Varela, A., y Mejia, C. (1992). Leaf demography and growth rates of *espeletia barclayana* Cuatrec. (compositae), a caulescent rosette in a colombian paramo. *BIOTROPICA*, 24, 52–63.
- Collada, C., Jimenez, P., y Gil, L. (2001). Análisis de la variabilidad de ADN de cloroplastos en *Quercus ilex* L., *Q. suber* L., y *Q. coccifera*. L. En *Actas del III Congreso Forestal Español*. Granada.
- Cuatrecasas, J. (1986). Speciation and radiation of the Espeletiinae in the Andes. En F. Vuilleumier y M. Monasterio (Eds.), *High altitude tropical biogeography* (pp. 267–303). New York: Oxford University Press.
- Daniell, H., Lin, C.-S., Yu, M., y Chang, W.-J. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17(1), 134.
- Desjardins, P., y Conklin, D. (2010). NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids 2 . High-Sensitivity Microvolume Nucleic Acid Quantitation Using the NanoDrop 3300. *Journal of Visualized Experiments*, 45, 1–4.
- Diazgranados. (2012). A nomenclator for the frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae). *PhytoKeys*, 16(0), 1–52.
- Diazgranados, M., y Barber, J. (2012). Geography shapes the phylogeny of frailejones (Espeletiinae Cuatrec., Asteraceae): a remarkable example of recent rapid radiation in sky islands. En *The next generation congress* (p. 7). Ohio.
- Erazo, D. (2011). *Estudio fenológico de Espeletica pycnophylla* Cuatrec. En *los páramos del infiernillo, Reserva natural Pueblo Viejo, Municipio de Mallama y Cerro Negro, Municipio de Puerres, Departamento de Nariño, Colombia*. Universidad de Nariño.
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. En *Ecología Molecular . Mexico* pp. 517–540.
- Fagua, J., y Bonilla, M. (2005). Ecología de la polinización de *Espeletia grandiflora* en el parque Chingaza. En M. Bonilla (Ed.), *Estrategias adaptativas de plantas de páramo y de bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia*. Bogotá: Unibiblos.
- Fernández-alonso, P. J. L. (2003). Algunos patrones de distribución y endemismo en plantas vasculares de los páramos de Colombia. En C. Jaramillo, C. Castaño, F. Arjona, J. Rodríguez, y C. Durán (Eds.), *Libro de memorias Congreso mundial de páramos Tomo*

- I* (Gente Nueva, pp. 213–229). Bogotá.
- Gaspar, M., Marcos de Souza, A., Carvalho, D., Isabel do Pinto, S., Oliveira, M., y Abjaud, R. (2006). Caracterización genética de *Calophyllum brasiliense* Camb. Em duas populações de mata ciliar. *Sociedade de Investigações Florestais*, 30(5), 821–827.
- Ge, X. J., Liu, M. H., Wang, W. K., Schaal, B. A., y Chiang, T. Y. (2005). Population structure of wild bananas, *Musa balbisiana*, in China determined by SSR fingerprinting and cpDNA PCR-RFLP. *Molecular Ecology*, 14(4), 933–944.
- Godoy, J. a. (2009). La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas*, 18(1), 23–33.
- Goncalves, A., Barrandeguy, M., y García, M. (2014). Estructura y representatividad genética cloroplástica en poblaciones naturales de *Andeanthera colubrina* Cebil (Leguminosae) de Argentina. *Boletín Sociedad Argentina de Botánica*, 49(2), 235–245.
- Gonzales, M., Baca, A., Lagos, L., Solarte, M., Ocaña, D., y Cepeda, B. (2009). *Estrategias adaptativas de Espeletia pycnophylla*, *Puya clava-herculis* y *Puya cryptantha* en los páramos de Cerro Negro (municipio de Puerres) y el Infiernillo, reserva natural Pueblo Viejo (municipio de Mallama) departamento de Nariño. Pasto.
- Griffith, G. W., y Shaw, D. S. (1998). Polymorphisms in *Phytophthora infestans*: Four mitochondrial haplotypes are detected after PCR amplification of DNA from pure cultures or from host lesions. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4007–4014.
- Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G. G., & Petit, R. J. (2001). Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, 1(4), 345–349.
- Gutiérrez, E. ., Rojas, S., y Stiles, F. . (2004). Dinámica anual de la interacción colibrí-Flor en ecosistemas altoandinos. *Ornitología Neotropical*, 15(1), 205–213.
- Hamilton, M. (Ed.). (2009). *Population genetics*. West Sussex: Blackwell.
- Hofstede, R., Calles, J., López, V., Polanco, R., Torres, F., Ulloa, J., ... Cerra, M. (2014). *Los páramos andinos ¿Qué sabemos? Estado de conocimiento sobre el impacto del cambio climático en el ecosistema páramo*. Quito: UICN.
- Hooghiemstra, Wijnnga, V., y Cleef, M. (2006). The Paleobotanical Record of Colombia :

- Implications for Biogeography and Biodiversity. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 93(2), 297–324.
- Kageyama, P. Y., Gandara, F. B., y Souza, L. M. I. De. (1998). Conseqüências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. *Série Técnica*, 12(32), 65–70.
- Loo, J. (2011). *Manual de genética de la conservación. Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica*. Mexico: SEMARNAT.
- Luteyn, J. (1999). Páramos, a checklist of plant diversity geographical distribution and botanical literature. *Memoirs of the The New York Botanical Garden*, 84, 12–25.
- Mache, R., y Lerbs, S. (2001). Chloroplast genetic system of higher plants: Chromosome replication, chloroplast division and elements of the transcriptional apparatus. *Current Science*, 80(2), 217–224.
- Marchelli, P., y Gallo, L. (2006). Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics*, 7(4), 591–603.
- Martinez, V., Paz, D., Lagos, L., y Álvarez, S. (2014). Estandarización de un protocolo de extracción de adn de *Espeletia pycnophylla* del páramo Bordoncillo (Nariño, Colombia). En *Memorias del LXIX congreso nacional de la ACCB* (pp. 1–323). Sincelejo.
- Maya, A. M. G., y Gómez, M. A. B. (2016). Caracterización de micrositos para el establecimiento de plántulas de *Espeletia uribei* (Asteraceae). *Acta Biológica Colombiana*, 21(2), 387–398.
- Medina, G., y Hofstede, R. (Eds.). (2001). *Los páramos del Ecuador. Particularidades, Problemas y Perspectivas*. Quito: Abya Yala y Proyecto Páramo.
- MINCIT. (2012). *Plan de desarrollo turístico de Nariño* (Vol. 53). Pasto. Recuperado de <http://www.mincit.gov.co/minturismo/descargar.php?id=66532>
- Miranda-Esquivel, D. R., Rangel, O. J., y Roa-Fuentes, L. L. (2001). Endemismos en Paramos Colombianos con Base en la Distribucion de Espermatofitos y el Analisis de Parsimonia de Endemismo (PAE). In C. Ange, C. Castaño, F. Arjona, J. Rodríguez, y C. Durán (Eds.), *Congreso Mundial de Páramos* (pp. 253–266). Bogotá: Ministerio del Medio Ambiente - Corporación Autónoma Regional de Cundinamarca - Instituto de Hidrologia, Metereologia y Estudios Ambientales - Conservación Internacional

Colombia.

- Mohanty, A., Martín, J. P., y Aguinagalde, I. (2002). Population genetic analysis of European *Prunus spinosa* (Rosaceae) using chloroplast DNA markers. *American Journal of Botany*, 89(8), 1223–1228.
- Monasterio, M., y Sarmiento, L. (1991). Adaptive radiation of *Espeletia* in the cold Andean tropics. *Trends in Ecology and Evolution*, 6, 387–391.
- Morales, M., Otero, J., Van der Hammen, T., Torres, A., Cadena, C., Pedraza, C., ... Cárdenas, L. (2007). *Atlas de páramos de Colombia*. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt (IAvH).
- Muse, S. V. (2000). Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Molecular Biology*, 42(1), 25–43.
- Otero, E., Mosquera, L., Sílva, G., y Guzman, J. (Eds.). (2001). *Paramos de Colombia*. Bogotá: IM Editores.
- Palacio-Mejía, J. D. (2005). *Estudio comparativo de la diversidad genética y divergencia evolutiva entre la especie vulnerable Colombobalanus excelsa (Lozano et. al.) Nixon y Crepet y el roble común Quercus humboldtii BondPL.: Implicaciones para la Biología de la conservación*. Universidad Nacional de Colombia.
- Pock Tsy, J. M. L., Lumaret, R., Mayne, D., Vall, A. O. M., Abutaba, Y. I. M., Sagna, M., ... Danthu, P. (2009). Chloroplast DNA phylogeography suggests a West African centre of origin for the baobab, *Adansonia digitata* L. (Bombacoideae, Malvaceae). *Molecular Ecology*, 18(8), 1707–1715.
- Rangel-Ch, J. (Ed.). (2000). *Colombia Diversidad Biotica III. Colombia Diversidad Biótica III. La región de vida paramuna*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Rasmussen, H. B. (2012). Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. En Sameh Magdeldin (Ed.), *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* (pp. 315–334). InTech.
- Renteria, M. (2007). Breve revisión de marcadores moleculares. In L. Eguiarte, V. Souza, y X. Aguirre (Eds.), *Ecología Molecular* (pp. 541–554). Mexico: SEMARNAT.
- Sales, E., Nebauer, S., Mus, M., y Segura, J. (2001). Population genetic study in the Balearic endemic plant species *Digitalis minor* (Scrophulariaceae) using RAPD markers.

- American Journal of Botany*, 88(1–12), 1750–1759.
- Sánchez, A. (2004). *Análisis Morfométrico y demográfico de Espeletia pycnophylla Cuatrecasas, en un gradiente altitudinal, provincia de Carchi - Ecuador*.
- Särkinen, T., Pennington, R. T., Lavin, M., Simon, M. F., y Hughes, C. E. (2012). Evolutionary islands in the Andes: persistence and isolation explain high endemism in Andean dry tropical forests. *Journal of Biogeography*, 39(5), 884–900.
- Sarmiento, C., Cadena, C., Sarmiento, M., y Zapata, L. (2013). *Aportes a la conservación estratégica de los páramos de Colombia: actualización de la cartografía de los complejos de páramo a escala 1:100.000*. Bogotá. Recuperado de <http://www.humboldt.org.co/es/biblioteca/publicaciones/publicaciones>
- Schlogl, P. S., de Souza, A. P., y Nodari, R. O. (2007). PCR-RFLP analysis of non-coding regions of cpDNA in *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. *Genetics and Molecular Biology*, 30(2), 423–427.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., y Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94(3), 275–288.
- Sklenář, P., Dušková, E., y Balslev, H. (2011). Tropical and temperate: evolutionary history of páramo flora. *Botanical Review*, 77(2), 71–108.
- Smith, A. P. (1981). Growth and population dynamics of *Espeletia* (Compositae) in the Venezuelan Andes. *Smithsonian Contributions to Botany*, (48), 1–45.
- Solarte, M. ., Narváez, G., Rivas, G., Bacca, A., Muñoz, D., Calderón, J., ... Castillo, G. (2007). *Tomo I. Informe final: Proyecto estado del arte de la información biofísica y Socioeconómica de los páramos de Nariño: Introducción, Descripción General, Marco Conceptual y Metodológico*. Pasto. Recuperado de <http://corponarino.gov.co/expedientes/intervencion/biodiversidad/tomo01introduccion.pdf>
- Squeo, F. A., Rada, F., Azocar, A., y Goldstein, G. (1991). Freezing tolerance and avoidance in high tropical Andean plants: Is it equally represented in species with different plant height? *Oecologia*, 86(3), 378–382.
- Templeton, A. R., Boerwinkle, E., y Sing, C. F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic

- associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, *117*(2), 343–351.
- Van Droogenbroeck, B., Kyndt, T., Maertens, I., Romeijn-Peeters, E., Scheldeman, X., Romero-Motochi, J. P., ... Gheysen, G. (2004). Phylogenetic analysis of the highland papayas (*Vasconcellea*) and allied genera (Caricaceae) using PCR-RFLP. *Theoretical and Applied Genetics*, *108*(8), 1473–1486.
- Vargas, O., Pérez, L., Insuasty, J., Melgarejo, L., y Rodríguez, N. (2014). *Semillas de plantas de páramo: ecología y métodos de germinación aplicados a la restauración ecológica*.
- Vekemans, X., Hardy, O., y Berken, B. (1998). Use of PCR-RFLP on chloroplast DNA to investigate phylogenetic relationships in the genus *Phaseolus*. *Biotechnologie, Agronomie, Societe et Environnement*, *2*(2), 128–134.
- Wicke, S., Schneeweiss, G. M., DePamphilis, C. W., Miller, K. F., y Quandt, D. (2011). The evolution of the plastid chromosome in land plants: Gene content, gene order, gene function. *Plant Molecular Biology*, *76*(3–5), 273–297.
- Woods, S., Ortiz-Crespo, F., y Ramsay, P. M. (1998). Presence of giant hummingbird (*Patagona gigas*) and Ecuadorian hillstar (*Oreotrochilus chimborazo jamesoni*) at the Ecuador - Colombia border. *Cotinga*, *10*(July 1991), 37–40.
- Zheng, W., Chen, J., Hao, Z., y Shi, J. (2016). Comparative Analysis of the Chloroplast Genomic Information of *Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook with Sibling Species from the Genera *Cryptomeria* D. Don, *Taiwania* Hayata, and *Calocedrus* Kurz. *International Journal of Molecular Sciences*, *17*(7), 1084.

ANEXOS

Anexo 1. Revisión bibliográfica de estudios basados en el análisis de variabilidad genética usando la técnica PCR-RFLP en plantas.

Referencia	Investigación	No. primers propuestos	No. primers amplificados	Haplotipos generados
(Vekemans et al., 1998)	Diversidad genética y relaciones filogenéticas genero <i>Phaseolus</i>	3	3	36
(Collada et al., 2001)	Análisis de variabilidad genética en tres especies del genero <i>Quercus</i>	5	5	29
(Mohanty et al., 2002)	Análisis de variabilidad genética <i>Prunus spinosa</i>	6	3	32
(Besnard et al., 2002)	Filogeografía de <i>Olea erupaea</i>	6	2	15
(Van Droogenbroeck et al., 2004)	Relaciones filogenéticas en genero <i>Vasconcellea</i>	6	3	15
(Ge et al., 2005)	Estructura genética poblacional en <i>Musa balbisiana</i>	5	5	21
(Palacio-Mejía, 2005)	Diversidad genética <i>Quercus humboltii</i> y <i>Colombobalanus excelsa</i>	9	6	5
(Marchelli y Gallo, 2006)	Diversidad genética y relaciones filogeograficas de <i>Nothofagus nervosa</i>	16	2	5
(Schlogl et al., 2007)	Diversidad genética en <i>Araucalia angustifolia</i>	17	6	12
(Pock Tsy et al., 2009)	Relaciones filogeografía de <i>Adansonia digitata</i>	5	3	5
(Azpilicueta et al., 2009)	Relaciones eventos geográficos del cuaternario con la variabilidad en poblaciones de <i>Nothofagus obliqua</i>	9	6	14

Anexo 2. Capturas de pantalla de los resultados obtenidos de la digestión con enzimas de restricción *in silico*.

EcoRI (G^AATT_C)
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 234.
 Fragment sizes 234, 1016.

HaeIII (GG^CC) [BshFI, BsnI, BsuRI]
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 504.
 Fragment sizes 504, 768.

HindIII (A^AGCT_T)
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 482.
 Fragment sizes 482, 768.

MboII (GAGG^mrrrrrrrr_n^)
 [dam methylated]
 Cuts 2 times.
 Cuts at positions 258, 698.
 Fragment sizes 552, 440, 258.

MseI (T^TA_A) [SaqAI, TruII, Tru9I]
 Cuts 13 times.
 Cuts at positions 185, 242, 370, 388, 424, 433, 454, 611, 622, 708, 870, 1123, 1220.
 Fragment sizes 185, 57, 128, 18, 9, 21, 157, 11, 86, 162, 253, 97, 66.

TaqI (T^CG_A)
 [dam methylated]
 Cuts 6 times.
 Cuts at positions 569, 858, 1140, 1203, 1279.
 Fragment sizes 565, 259, 282, 63, 76, 7.

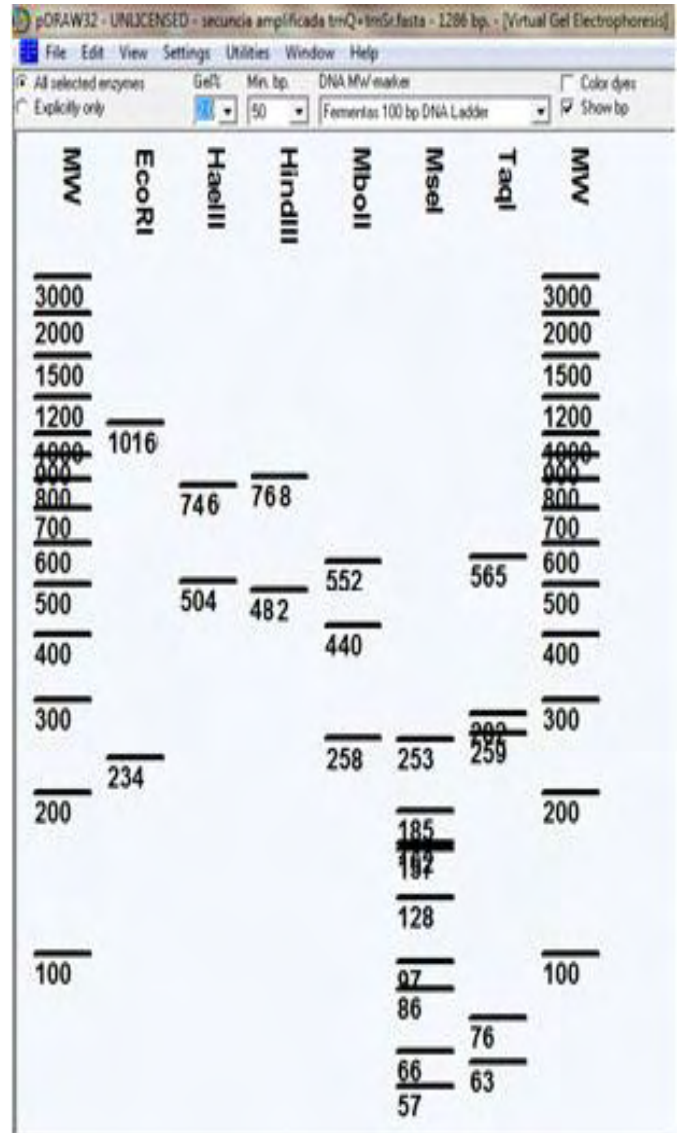


Imagen I: Capturas de pantalla de la técnica de PCR-RFLP *in silico* para la región intergénica trnQ

EcoRI (G'AATT_C)
 Cuts 2 time.
 Cuts at position 120, 684.
 Fragment sizes 120, 564, 243.

HaeIII (GG'CC)
 [BehFI,BanI,BsuRI]
 Enzyme does not cut.

HindIII (A'AGCT_T)
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 353.
 Fragment sizes 353, 574.

MboI (GAAGAnnnnnn_n')
 [dam methylated]
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 635.
 Fragment sizes 635, 292.

MseI (T'TA_A)
 [SagAI,TruII,Tru9I]
 Cuts 10 times.
 Cuts at positions 85, 191, 255, 395, 433, 439, 501, 578, 672, 704.
 Fragment sizes 85, 106, 64, 140, 38, 6, 62, 60, 94, 32, 240.

TaqI (T'CG_A)
 [dam methylated]
 Enzyme does not cut.

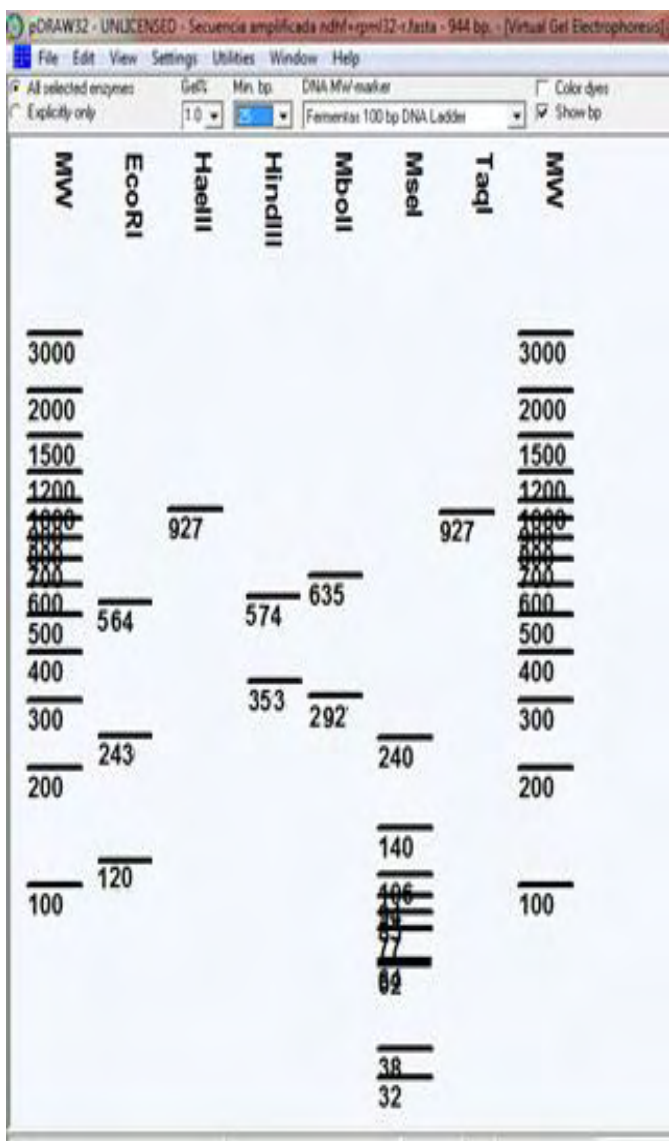


Imagen II: Capturas de pantalla de la técnica de PCR-RFLP *in silico* para la región intergénica ndhF

EcoRI (G'AATT_C)
 Cuts 2 time.
 Cuts at position 236, 675.
 Fragment sizes 256, 439, 186.

HaeIII (GG'CC)
 [BshFI,BsnI,BsuRI]
 Enzyme does not cut.

HindIII (A'AGCT_T)
 Cuts 1 time.
 Cuts at position 103.
 Fragment sizes 103, 758.

MboII (GAACAnnnnnnn_n')
 [dam methylated]
 Cuts 2 times.
 Cuts at positions 275, 409.
 Fragment sizes 275, 134, 452.

MseI (T'TA_A)
 [SaqAI,TruII,Tru9I]
 Cuts 11 times.
 Cuts at positions 205, 3711, 413, 422, 532, 667, 737, 757, 778, 785, 796.
 Fragment sizes 205, 166, 42, 9, 110, 135, 70, 20, 21, 7, 11, 65.

TaqI (T'CG_A)
 [dam methylated]
 Cuts 4 times.
 Cuts at positions 45, 570, 697, 775.
 Fragment sizes 45, 525, 127, 78, 86.

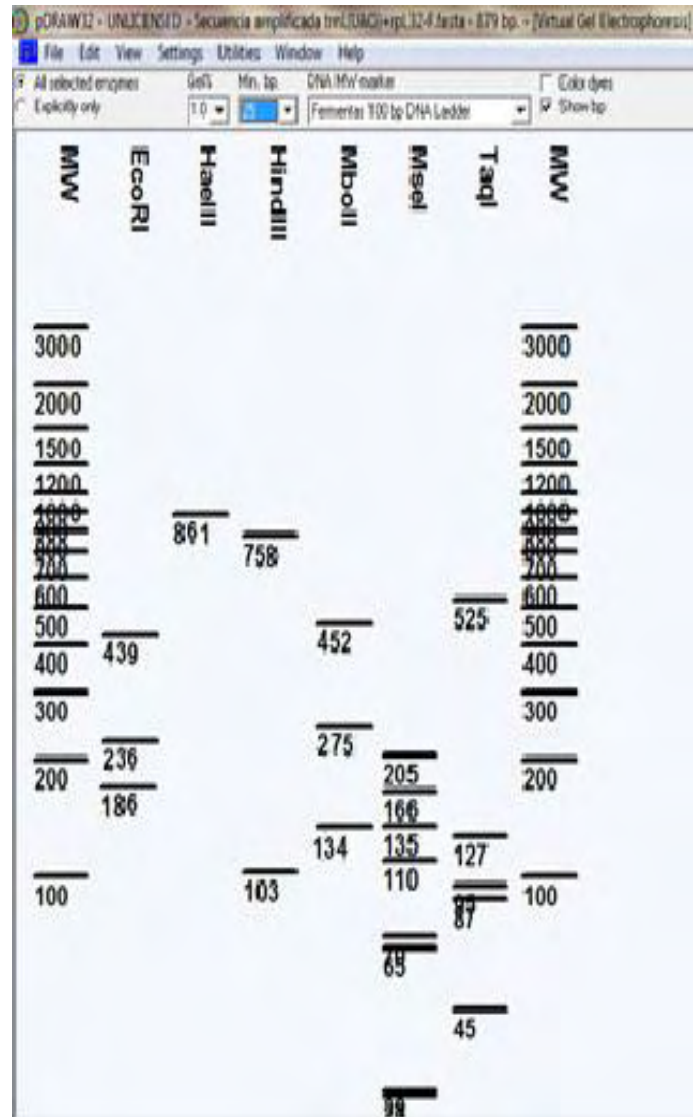


Imagen III: Capturas de pantalla de la técnica de PCR-RFLP *in silico* para la región intergénica trnL(UAG)