



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ÁREA BIOLÓGICA

TÍTULO DE BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

**“Cambios en las características morfológicas y genéticas de *Croton* sp.
en un gradiente altitudinal en matorral seco”.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

AUTORA: Leal Cerdán, María del Cisne.

DIRECTORA: Gusmán Montalván, Elizabeth del Carmen, Ing.

LOJA – ECUADOR

2015



Esta versión digital, ha sido acreditada bajo la licencia Creative Commons 4.0, CC BY-NY-SA: Reconocimiento-No comercial-Compartir igual; la cual permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra, mientras se reconozca la autoría original, no se utilice con fines comerciales y se permiten obras derivadas, siempre que mantenga la misma licencia al ser divulgada. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Septiembre, 2015

APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Ingeniera.

Elizabeth del Carmen Gusmán Montalván

DOCENTE DE LA TITULACIÓN

De mi consideración:

El presente trabajo de titulación **Cambios en las características morfológicas y genéticas de *Croton* sp en un gradiente altitudinal en matorral seco.**”, realizado por María del Cisne Leal Cerdán ha sido orientado y revisado durante su ejecución, por cuanto se aprueba la presentación del mismo.

Loja, Septiembre de 2015

f).....

DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo, María del Cisne Leal Cerdán declaro ser autora del presente trabajo de titulación: **“Cambios en las características morfológicas y genéticas de *Croton sp* en un gradiente altitudinal en matorral seco”**, de la titulación de Bioquímico Farmacéutico, siendo: Elizabeth Gusmán Montalván, director (a) del presente trabajo; y eximo expresamente a la Universidad Técnica Particular de Loja y a sus representantes legales de posibles reclamos o acciones legales. Además certifico que las ideas, conceptos, procedimientos y resultados vertidos en el presente trabajo investigativo, son de mi exclusiva responsabilidad.

Adicionalmente declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 88 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado o trabajos de fin de titulación que se realicen con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”.

f) -----

Autora: María del Cisne Leal Cerdán

Cédula: 110323968-5

DEDICATORIA

A Dios

Principio de sabiduría y fortaleza, por no permitirme decaer.

A mi Madre

Magdalena por su amor incondicional, y esfuerzo inagotable.

A mi Padre

Álvaro, espero tu ausencia haya valido la pena.

A mis hermanas

Karen y Anabell por ser mis amigas, cómplices y por enseñarme el verdadero valor de la vida.

A mi mamita

Esther por sus palabras de aliento y sus consejos de vida.

A mis abuelitos

Emilio (+), Jeremías (+) y Elena (+) que aunque no cuento con su presencia física sé que desde el cielo son mis ángeles y guías. Los extraño.

A mis amigos por su apoyo y consejos acertados en cada momento de mi vida.

María del Cisne

“Es, pues, la Fe la certeza de lo que se espera, la convicción de lo que no se ve.”

Hebreos 11:1

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por sus múltiples bendiciones durante mi vida, por concederme a mi madre y hermanas, pilares fundamentales en mí caminar.

Al Divino Niño por brindarme la fortaleza necesaria y permitirme culminar mi sueño.

A la Universidad Técnica Particular de Loja, especialmente a la titulación de Bioquímica y Farmacia por impartirme conocimientos científicos y prácticos durante mi formación académica.

Al Departamento de Ciencias Naturales por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, en calidad de becaria y tesista.

A mi directora de tesis Ing. Elizabeth Guzmán por brindarme su amistad, apoyo y asesoría incondicional durante la realización del presente trabajo.

A la Blga. Lorena Riofrío por su colaboración incondicional para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

Al Mat. Pablo Ramón por su ayuda, asesoría y predisposición en el análisis de los resultados.

Al Dr. Carlos Iván Espinosa por su colaboración y generosidad durante la revisión del presente.

A la Dra. Isabel Márquez por su ayuda y colaboración en el análisis de los resultados.

María del Cisne

ABREVIATURAS

	Significado
ADN	ácido desoxirribonucleico
AFE	área foliar específica
AFLP	polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados
AH	área de la hoja
AIC	criterio de información de Akaike
°C	grados centígrados
Cm	centímetro
cm ²	centímetro cuadrado
CMS	contenido de materia seca
DM	densidad de madera
G	gramos
M	metros
Mg	miligramos
mm ²	milímetro cuadrado
m s.n.m	metros sobre el nivel del mar
Pb	pares de bases
PCA	análisis de componentes principales
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PLP	proporción de loci polimórficos
RFU	unidades de fluorescencia relativa
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
TCR	tasa de crecimiento relativo
Uv	luz ultravioleta
µL	microlitro

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CARATULA	i
APROBACIÓN DE LA DIRECTORA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	ii
DECLARACIÓN DE AUTORIA Y CESIÓN DE DERECHOS	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
RESUMEN EJECUTIVO	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
Objetivo general.	6
Objetivos específicos	6
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2. Metodología	8
2.1. Ubicación y descripción de la zona de estudio	8
2.2. Colección de datos de campo.	9
2.2.1. Datos morfológicos.	9
2.3. Marcadores moleculares.	12
2.4. Ventajas de usar AFLP	12
2.5. Datos genéticos.	13
2.5.1. Extracción de ADN.	13
2.5.2. Cuantificación de ADN	13
2.5.3. Técnica de AFLP.	13
2.5.4. Análisis de AFLP.	14
2.6. Análisis de datos.	15
2.6.1. Análisis de la estructura de población.	15
CAPÍTULO 3. RESULTADOS	17
3.1. Morfología	18
3.1.1. Altura de la planta	18
3.1.2. Área de la hoja	19
3.1.3. Cobertura de la planta.	20
3.1.4. Contenido de materia seca (CMS):	20
3.2. Genética.	21
3.2.1. Técnica de AFLP.	21

3.2.2. Perfiles AFLP.....	21
3.3. Análisis genético.....	21
3.4. Grupos genéticos.....	23
DISCUSIÓN.....	24
CONCLUSIONES.....	28
RECOMENDACIONES.....	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
ANEXOS.....	34

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Combinaciones usadas de primers.....	13
Tabla 2. Número de loci polimórficos por nivel y porcentaje de polimorfismo.	21
Tabla 3. Parámetros poblacionales obtenidos con los programas AFLP-SURV y STRUCTURE en los individuos muestreados de <i>Croton</i> sp. a diferentes altitudes.	22

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de ubicación de la zona de estudio.	8
Figura 2. Medición de la altura en <i>Croton</i> sp.	9
Figura 3. Medición de la Copa en <i>Croton</i> sp.	10
Figura 4. Escaneo de las hojas de <i>Croton</i> sp.	11
Figura 5. Pesado de las hojas de <i>Croton</i> sp.	12
Figura 6. Esquema de la técnica de AFLPs.	14
Figura 7. PCA de la especie <i>Croton</i> sp. en matorral seco en el cantón Catamayo.....	18
Figura 8. Altura de la especie <i>Croton</i> sp. a diferentes niveles altitudinales en un matorral seco en el cantón Catamayo.	18
Figura 9. Área de la hoja de la especie <i>Croton</i> sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.	19
Figura 10. Cobertura de la hoja de la especie <i>Croton</i> sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.	20
Figura 11. CMS de la especie <i>Croton</i> sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.	20
Figura 12. Resultados de GeneMapper de perfiles AFLPs.	21
Figura 13. Representación de la estructura poblacional obtenida para las especies de <i>Croton</i> sp. colectadas a diferentes niveles altitudinales.	23
Figura 14. Grupos genéticos presentes en matorral seco en el cantón Catamayo.....	23

RESUMEN EJECUTIVO

La distribución de las especies a lo largo de gradientes altitudinales está relacionada a ciertos cambios ambientales, lo que a su vez, induce a que las plantas modulen su morfología y con el paso del tiempo estas se traduzcan en variantes a nivel genético. Cuatro niveles altitudinales a lo largo de un gradiente entre 1400 y 1800 m s.n.m fueron seleccionados. En cada nivel se midieron los rasgos morfuncionales y se obtuvo una caracterización genética de 40 individuos muestreados al azar. Se midieron cinco rasgos funcionales: CMS (contenido de materia seca), altura, cobertura, área de la hoja y AFE (área foliar específica). La caracterización genética se la realizó mediante la técnica molecular de AFLP (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados). El análisis de regresión lineal reveló que los extremos de la gradiente (1400-1800 m s.n.m.) y las elevaciones intermedias (1550-1650 m s.n.m.) se encuentran compartiendo características morfológicas. A nivel genético se puede observar que existieron dos poblaciones bien definidas en los extremos de la gradiente, mientras que en las elevaciones intermedias los individuos comparten genes de ambas poblaciones.

Palabras clave: *Croton* sp, diversidad genética, características morfológicas, gradiente altitudinal, plasticidad fenotípica.

ABSTRACT

The species distribution along altitudinal relates to certain environmental changes, which in turn leads to modulate plant morphology and over time they have concrete variants genetic level. Four altitude along a gradient from 1400 to 1800 m above sea level were selected. At each level the morfuncionales traits were measured and genetic characterization of 40 randomly sampled individuals was obtained. CMS (dry matter), height, cover, leaf area and SLA (specific leaf area): five functional traits were measured. The genetic characterization was performed using the molecular technique (AFLP polymorphism amplified fragment length). The linear regression analysis revealed that the ends of the gradient (1400-1800 m a.s.l) and intermediate elevations (1550-1650 m a.s.l) are sharing morphological characteristics. At the genetic level it can be observed that there were two well defined at the ends of the gradient populations, whereas at intermediate elevations individuals of both populations share genes.

Keywords: *Croton* sp, genetic diversity, morphological, altitudinal gradient, phenotypic plasticity.

INTRODUCCIÓN

La distribución de las especies a lo largo de gradientes altitudinales está relacionada a ciertos cambios ambientales, los que a su vez inducen a que las plantas modulen su morfología y por ello existan ciertas variantes a nivel genético (Nicotra et al. 2010). Las especies de plantas pueden responder a estas variaciones ambientales a través de adecuaciones morfológicas y/o de cambios a nivel genético. La predicción de estas respuestas a los cambios ambientales requiere una comprensión de la variación inducida en el fenotipo de los individuos (plasticidad fenotípica) y los mecanismos moleculares subyacentes a estas respuestas (Nicotra et al. 2010). La plasticidad fenotípica es una fuente de amplia variación fenotípica que puede promover la divergencia adaptativa y, por tanto, la evolución y especiación (West-Eberhard 2003). Muchos estudios han demostrado que las plantas poseen una alta plasticidad para numerosos rasgos de importancia ecológica, que van desde lo morfológico, fisiológico hasta lo genético (Sultan 2000).

En las últimas dos décadas la plasticidad fenotípica de las plantas se ha convertido en un tema central de la investigación ecológica y evolutiva. Estos estudios de plantas con el medio ambiente es más importante en plantas con larga vida útil, como los árboles o arbustos, que puede experimentar grandes cambios en las condiciones climáticas durante su tiempo de vida (Rehfeldt et al. 2001; Valladares et al. 2005).

La plasticidad se prevé que evoluciona cuando una especie se somete a la heterogeneidad ambiental (Sultan et al. 1998; Valladares et al. 2000, 2002;. Herman et al. 2014). Por lo tanto, las especies que se distribuyen a través de gradientes ambientales presentan un sistema ideal para examinar los conductores y las consecuencias de la variación fenotípica. Los gradientes altitudinales están entre los más poderosos "experimentos naturales" para realizar pruebas ecológicas y evolutivas de la biota, ofreciéndonos a veces la mejor oportunidad de estudiar las respuestas de las plantas y su adaptación bajo ciertas condiciones ambientales (Cordell et al. 1999;. Pellissier et al. 2010; Song et al. 2011; Lee et al. 2014) como la temperatura, precipitación entre otros (Salto et al. 2009)

La relación entre el gradiente altitudinal y la morfología de la planta es de gran interés para los fisiólogos vegetales, ecólogos y paleobotánicos. El gradiente altitudinal es uno de los factores más importantes que determinan condiciones de los micrositios que afectan a la morfología y la fisiología como la hoja dentro de una especie (Jian et al.

2009). Craine & Lee (2003). indicaron que a través de gradientes ambientales, es importante saber cómo los rasgos funcionales de las especies individuales cambian y cómo los rasgos de especies difieren dentro de un sitio (Craine & Lee, 2003). Sin embargo, pocos estudios han examinado rasgos de la hoja y sus relaciones en las especies individuales a lo largo un gradiente altitudinal (Ackerly et al. 2002;. Jian et al. 2009). Nuestro estudio se centró en determinar los efectos del gradiente altitudinal en la morfología y variación genética de *Croton* sp. en un matorral seco.

El género *Croton* de la familia Euphorbiaceae es amplio y diverso, comprende al menos 800 especies de los trópicos y subtrópicos (Webster 1993), en su revisión infragenérica reconoce 40 secciones de *Croton*, de esta sección podemos citar tres especies distribuidas para Ecuador: *C. alnifolius* Lam., *C. rivinifolius* Kunth y *C. wagneri* Müll. Arg. (Jorgensen & León, 1999; Aguirre & Kvist, 2005). El género *Croton* se distribuye desde el Carchi hasta la Zona Austral entre 1000 a 2500 msnm, que pierde parcialmente su cobertura foliar en la época seca posee látex, hojas simples alternas, un par de glándulas en el ápice del peciolo y la presencia de estípulas. Por sus características ecológicas es considerada como una especie nodriza en el matorral seco; arbusto que provee de protección a sus plántulas y a otras especies en un ambiente hostil, mientras ellas crecen lo suficiente para enfrentar los embates del medio por sí mismas (Valencia et al. 2000).

Nuestros objetivos fueron: 1) evaluar los cambios morfológicos de *Croton* sp. en cuatro niveles del gradiente altitudinal; y 2) determinar si existen variaciones genéticas en la población de *Croton* sp a lo largo del gradiente altitudinal.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Evaluar el efecto del gradiente altitudinal sobre las características morfológicas y genéticas de *Croton* sp. en matorral seco en la provincia de Loja.

Objetivos específicos.

1. Evaluar los cambios morfológicos de *Croton* sp. en diferentes niveles de gradientes altitudinales.
2. Determinar si existen variaciones genéticas en *Croton* sp. en los diferentes niveles altitudinales en estudio.

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2. Metodología.

2.1. Ubicación y descripción de la zona de estudio.

El estudio se realizó en matorral seco en la Hacienda “Alamala” del cantón Catamayo, provincia de Loja; en un rango altitudinal de 1400 a 1800 m s.n.m, entre las coordenadas 03° 58' 29" de Latitud Sur y 01° 25' 22" de Longitud Oeste (Figura 1). Este ecosistema es una variante de los bosques secos Tumbesinos, que se encuentra en los valles inter-andinos, normalmente estos ecosistemas poseen un gradiente altitudinal de alrededor de 1000 m (Espinosa et al. 2011). La temperatura media anual es de 27,5 °C, la temperatura máxima media es de 30,8 °C (en octubre) y la temperatura media mínima es de 17,9 °C (en junio). La precipitación media y la evapotranspiración son 383 mm/año y 1112 mm/año respectivamente (Espinosa et al. 2011). Entre mayo y diciembre las lluvias no compensan la evapotranspiración local, lo que provoca un déficit de agua intensa. El sustrato geológico está conformado por rocas metamórficas paleozoicas mezclados con rocas volcánicas y sedimentarias de los períodos Cretácico y Terciario. La vegetación constituye manchas de especies perennes intercaladas con áreas de tierra desnuda donde las plantas anuales son dominantes en invierno. *Croton* sp. (Euphorbiaceae) es la especie dominante en la formación de matorral (Richter & Moreira-Muñoz 2005).

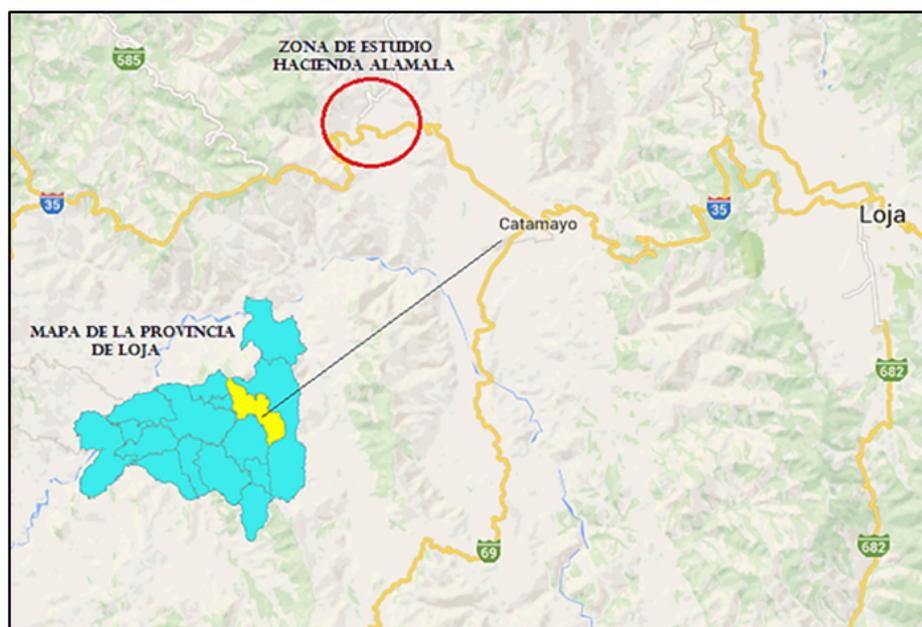


Figura 1. Mapa de ubicación de la zona de estudio.

Fuente: Tomado de Google Maps, Junio 2015, modificado por la autora

Rasgos funcionales.

Los rasgos o características funcionales son definidos como las características morfológicas, fisiológicas o fenológicas medibles a nivel de individuo. Estos caracteres afectan indirectamente el desarrollo a través de modificar tres componentes del rendimiento individual; crecimiento, reproducción y supervivencia (Violle et al. 2007).

2.2. Colección de datos de campo.

2.2.1. Datos morfológicos.

Recolección del material Vegetal: La obtención de material vegetal se lo realizó en 16 parcelas de 30 x 30 m previamente instaladas a lo largo de un gradiente altitudinal en cuatro elevaciones (1400, 1550, 1700 y 1800 m s.n.m), dos parcelas en relieve plano y dos en pendiente por cada nivel.

Rasgos morfológicos: se seleccionaron 40 individuos de *Croton* sp. al azar, tomando como caracteres los siguientes atributos morfométricos por su importancia en el desarrollo y funcionalidad de la planta.

Altura: La altura máxima de la planta se asocia con el vigor competitivo, la fecundidad, y la tolerancia frente a condiciones de estrés. Es la distancia más corta entre el límite superior de los principales tejidos fotosintéticos en una planta y el nivel del suelo, el acceso a la luz es el principal factor que dirige el crecimiento vertical de las plantas (Falster & Westoby 2003). El atributo altura se midió en centímetros, desde la base de la planta hasta su ápice, utilizando una cinta métrica (Cornelissen et al. 2003).



Figura 2. Medición de la altura en *Croton* sp.

Cobertura de la planta: La morfometría del dosel arbustivo brinda una idea de las relaciones interdimensionales, el espacio vertical ocupado por cada árbol, el grado de competencia, la estabilidad, vitalidad y productividad de cada individuo. El diámetro de la cobertura refleja la dimensión del aparato fotosintético del árbol que está directamente relacionado con su capacidad de crecimiento (Durlo 2001). Arriaga (1993) afirma que a mayor medida de cobertura, las plantas impiden que la radiación solar alcance la superficie del suelo y atenúa las fluctuaciones térmicas, lo que constituye un refugio para las plántulas, además *Croton* conocida por ser una especie nodriza-facilitadora forma hábitats que se transforman en refugios libres de herbivoría lo que disminuye la competencia por efecto del pastoreo (Espinosa et al. 2011). Este atributo se midió utilizando una cinta métrica y tomando como referencia para la medida las ramas céntricas y más sobresalientes del arbusto.



Figura 3. Medición de la Copa en *Croton* sp.

Área de la hoja (AH): El tamaño de la hoja tiene consecuencias importantes para la energía de la hoja y el equilibrio de agua. La variación interespecífica en el tamaño de la hoja está ligada con la variación climática, factores filogenéticos, geología, altitud, estrés térmico, sequía, donde las hojas tienden a ser relativamente pequeñas. Los cambios que se pueden visualizar en este órgano a lo largo de un gradiente altitudinal influenciados por condiciones estresantes podrían ser un claro ejemplo de los intervalos que pueden ocupar las plantas en un hábitat determinado (Carlquist 1977). Además, se ha encontrado que las hojas de las herbáceas son más susceptibles a tener cambios en su estructura y función asociados a los gradientes altitudinales con respecto a las hojas de arbustos y árboles (Körner et al. 2013). Se conoce como área de la hoja al área de la superficie proyectada de un solo lado (envés) correspondiente a una sola hoja, expresada en mm^2 (Cornelissen et al. 2003).



Figura 4. Escaneo de las hojas de *Croton* sp.

Área foliar específica (AFA): Es una correlación positiva de la tasa de potencial de crecimiento relativo (tasa fotosintética). Lin et al. (2002) indica que mediante el área foliar es posible inferir procesos de transpiración, fotosíntesis, absorción de carbono, interceptación de radiación a nivel de árbol individual, bosque o ecosistema. Las especies con valores bajos corresponden a las “defensas” de la hoja en situaciones de estrés de recursos. Para estimar el SLA se procede a realizar la medición de un solo lado de la hoja fresca dividida por su masa secada en la estufa y expresada en g.

$$\text{AFA} = \frac{\text{área foliar cm}^2}{\text{peso seco (g)}}$$

En este proceso se debe evitar la deshidratación de las hojas, por lo que los datos deben ser procesados en el menor tiempo posible (Cornelissen et al. 2003).

Contenido de materia seca (CMS): es un rasgo importante de la ecología de las plantas porque se asocia con muchos aspectos críticos de crecimiento y la supervivencia de las mismas (Garnier et al., 2001; Shipley & Vu, 2002). Las hojas fueron pesadas en fresco e introducidas en la estufa a 80°C para su desecación (temperaturas más elevadas provocan que se evaporen también las esencias), a las 48 horas se extrajeron de la estufa, se pesaron y se determinó el CMS (Cornelissen et al. 2003). El CMS es la masa secada al horno (mg) de una hoja, dividida por su masa fresca saturada de agua (g), expresada en mg.

$$\text{CMS} = \frac{\text{Pf (peso fresco)} - \text{Ps (peso seco)}}{\text{Ps (peso seco)}} \times 100$$



Figura 5. Pesado de las hojas de *Croton* sp.

2.3. Marcadores moleculares.

Los marcadores moleculares varían desde la forma en que funcionan hasta su poder informativo y sus aplicaciones. Un marcador molecular es “cualquier diferencia fenotípica controlada genéticamente y utilizada en el análisis genético” (Nuez & Carrillo, 2000). Los AFLP constituyen una herramienta nueva e invaluable que ha permitido la identificación de genes implicados en un conjunto de caracteres, incluyendo caracteres adaptativos, así como los polimorfismos que causan la variación genética funcional. Los polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados, conocidos como AFLP pertenecen al grupo de marcadores bialélicos codominantes (Vos et al. 1995) segregan de forma mendeliana, y permiten analizar al azar regiones de ADN distribuidas en todo el genoma sin tener conocimiento previo de éste (Simpson et al. 1999). Los AFLP, combinan una aplicabilidad universal con alto poder de resolución, versatilidad y reproducibilidad; pueden producir patrones de complejidad variada de acuerdo al tipo de enzimas de restricción y la longitud de los iniciadores usados por la PCR (Castañón 2011). La base molecular de los polimorfismos de AFLP generalmente se origina en los nucleótidos, en donde se detectan cambios de un solo nucleótido (Rojas 2007).

2.4. Ventajas de usar AFLP.

Un gran número de reportes describen el uso de esta técnica para plantas, mapeo genético animal, diagnósticos clínicos, estudios filogenéticos, evaluación de la biodiversidad y tipificación de bacterias (Savelkoul et al.,1999 y Arnea, 2008). Los AFLP son marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que tiene la capacidad de detección de un gran número de loci, y presentan una mayor tasa de polimorfismo por ensayo en comparación con los RAPD y RFLP. La razón principal del incremento del uso de los AFLP como una herramienta molecular es que

proveen información de todo el genoma del organismo, además importantes características que incluyen: determinación de la estructura genética de poblaciones y su variabilidad genética, ser marcadores neutrales, producen un gran número de bandas polimórficas, son altamente reproducibles, se necesita pequeñas cantidades de ADN y pueden ser utilizadas en **análisis genéticos de poblaciones** (Mueller & Wolfenbarger, 1999).

2.5. Datos genéticos.

2.5.1. Extracción de ADN.

Se la realizó a partir de hojas secas, con un total de 10 muestras por elevación altitudinal. Las muestras fueron conservadas en gel de sílice, son hojas jóvenes que no presentaban signo de enfermedad o daño en su estructura para obtener un ADN de buena calidad, establecido por protocolo de QIAGEN-DNeasy Plant Mini Kit (Anexo 1).

Una vez extraído el ADN, se guardó en el congelador a -20 °C para su conservación.

2.5.2. Cuantificación de ADN.

Para comprobar la calidad y cantidad de ADN de las muestras se utilizó el análisis de espectrofotometría UV (Espectrofotómetro Nanodrop, 2000 Thermo Scientific), el método empleado proporciona una estimación simple y precisa de la concentración de da la muestra, sin embargo esto solo sucede si se encuentra puro, sin contaminación significativa de proteínas o solventes orgánicos que absorban las longitudes de onda cercanas (Puerta & Urreña, 2005).

2.5.3. Técnica de AFLP.

Utilizamos el kit AFLP Plant Mapping de Applied Biosystem siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. En la Figura 6 se esquematiza a mayor detalle los pasos de la Técnica usada (Ver anexo 2). Los primers usados fueron los siguientes:

Tabla 1. Combinaciones usadas de primers

Combinación de primers	EcoRI	Msel
1	ACA (FAM)	CAC
2	ACA (FAM)	CTC
3	ACA (FAM)	CTT

EcoRI-Msel: enzimas de restricción.

La digestión se realizó con dos enzimas de restricción, una de corte raro y una de corte frecuente, EcoRI que reconoce 6 pb /MseI que reconoce 4 pb dentro de una secuencia, al incubarlas con el ADN (2,5 µL) durante 2 horas a 37 °C, a los fragmentos de restricción se les adiciono 0,5 µL de una mezcla de adaptadores. Para la preamplificación se tomaron 1,34 µL de una dilución 1:10 del resultado de la ligación, y se agregaron 0,34 µL de la mezcla de cebadores, más 5 µL de Core mix. El termociclador se programó 72 °C durante 2 minutos, 94 °C durante 20 segundos - 56 °C y 72 °C durante 2 minutos, por 20 ciclos, 60 °C por 30 minutos y 4 °C. El resultado de esta PCR se corroboró con una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Para la amplificación se tomaron 5 µL de la dilución, 0,33 µL (MseI primers), 0,33 µL (EcoRI primers) y 5 µL de Core mix. El producto de la amplificación se observó en una electroforesis en gel de agarosa al 2 %.

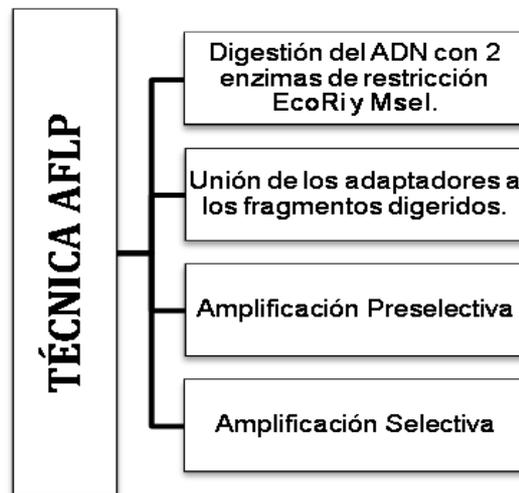


Figura 6. Esquema de la técnica de AFLPs.

2.5.4. Análisis de AFLP.

Los productos obtenidos de la amplificación selectiva se prepararon en un mix de carga que contiene: 500 µl de formamida y 7,5 µl de Liz 600, esto para 1 µl de producto de PCR, más 12 µl de tampón de carga. La mix se coloca en un plato de 96 pocillos para continuar con proceso de desnaturalización por 3 minutos a 95 °C en el termociclador Applied Biosystem; posteriormente el plato es llevado al Secuenciador ABI 3500.

2.6. Análisis de datos.

Análisis morfológicos.

Se efectuó un análisis de componentes principales (PCA), con el fin de realizar una agrupación y síntesis de los datos por elevación. Utilizamos modelos de regresiones lineales y cuadráticos para nuestros análisis, donde la selección del mejor modelo fue en base al mejor AIC (criterio de información de Akaike), el cual permite determinar con qué eficiencia los modelos se ajustan a una base de datos (Noguera et al. 2008). Todos los análisis se realizaron utilizando el entorno de programación R project versión 2.11.1.

Análisis Genéticos.

El tamaño de los alelos, en pares de bases, fue estimado en el software de genotipado automatizado GeneMapper ® versión 4.1 (Applied Biosystems) el cual designa picos en electroferogramas y nombra alelos a través de comparaciones de tamaño a una escala alélica. Este programa nos permite visualizar los perfiles de cada muestra según el fluorocromo aplicado y genera una matriz binaria con los datos obtenidos de alelos para cada genotipo en cada uno de los loci seleccionados. Se establece la distancia entre los bins para todas las muestras sea de 1 bp (pares de bases), y el rango del tamaño de los fragmentos tiene que estar entre 80-500 pb. Seguidamente, se exporta la altura de todos los picos como un documento delimitado por tabulaciones.

2.6.1. Análisis de la estructura de población.

Para estimar el flujo génico de una manera detallada y con mayor resolución muchos de los modelos teóricos surgen de los valores desarrollados por Sewall-Wright, quien introdujo un método para dividir el coeficiente de endogamia en una población subdividida en un componente debido a apareamientos no aleatorios dentro de poblaciones, definido como:

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

F_{st} mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, y por tanto la diferenciación genética entre ellas (donde H_t es el promedio de la heterocigosis esperada en la población total, para todos los loci, y H_s es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci (Slatkin 1989).

La estructura genética fue evaluada mediante el programa STRUCTURE, el cual implementa un modelo de agrupamiento basado en un modelo estadístico Bayesiano usando datos genotípicos de marcadores no ligados (Pritchard et al. 2000 & Falush et al. 2003). Una de las aplicaciones consiste en demostrar la presencia de una estructura poblacional, identificando distintas subpoblaciones genéticas o asignando individuos a subpoblaciones en las que se logre el equilibrio de **Hardy-Weinberg**. Se trata de un algoritmo de análisis de clúster, basado en criterios de genética de poblaciones (probabilidad-condicionada) y en donde los individuos son asignados probabilísticamente a uno de K (número de poblaciones), donde K puede tomar sucesivos valores desde k=1 hasta un número definido por el usuario, máximo k=10 (definido por el protocolo del programa). Al final del análisis se puede determinar el valor de K que tiene mayor probabilidad (Falush et al. 2003). En este caso, se probaron valores desde k=1 hasta k=10, usando el análisis de estructura el modelo de mezcla de ancestros (admixture model), en el cual los individuos/poblaciones podrían tener un conjunto de ancestros comunes, se puede asumir que la población ha heredado una fracción de su genoma del grupo K. Cada corrida tuvo un “burn-in” de 100000 pasos, seguido de 5 interacciones. El número de grupos genéticos más probable se encontró determinando el valor máximo de estadístico ΔK , según el método de (Evanno et al. 2005).

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

3.1. Morfología.

La ordenación que realizamos en el PCA, observamos que en las elevaciones de los extremos 1 y 4 (1400 y 1800 m s.n.m respectivamente) muestran características similares. Del mismo modo las elevaciones intermedias 2 (1550 m s.n.m) y 3 (1650 m s.n.m) se correlacionan al encontrarse compartiendo características en el mismo eje.

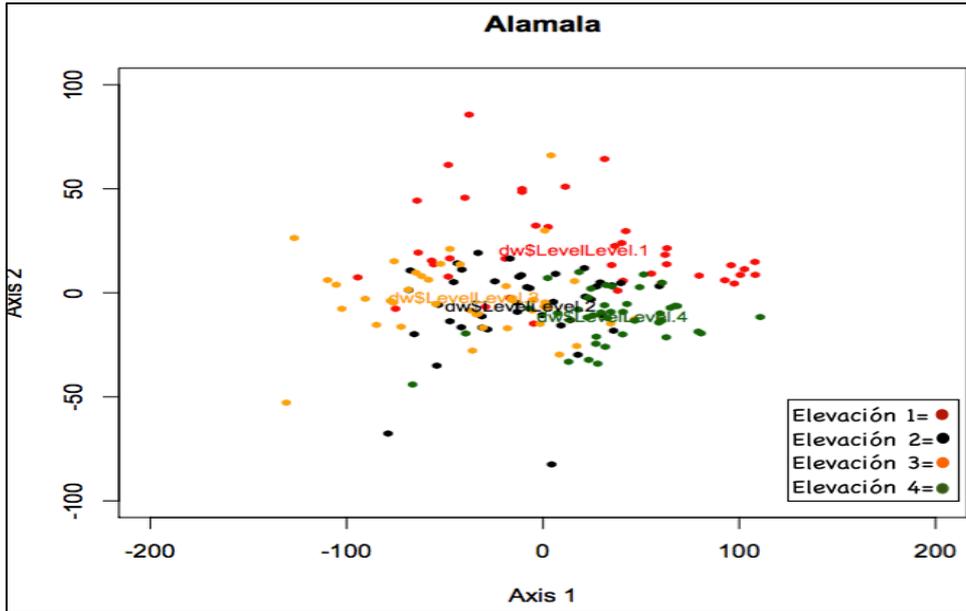


Figura 7. PCA de la especie *Croton* sp. en matorral seco en el cantón Catamayo.

3.1.1. Altura de la planta.

En el caso de altura de la planta el mejor modelo que se ajusta fue el cuadrático, el cual se pudo obtener en base al mejor AIC=1359.96, en donde observamos que las elevaciones de 1550 y 1650 m s.n.m, se encuentran los individuos de *Croton* sp. con mayor tamaño alcanzando los 102 cm, sin embargo en las elevaciones 1 y 4 encontramos las plantas con menor tamaño alcanzando los 65 cm.

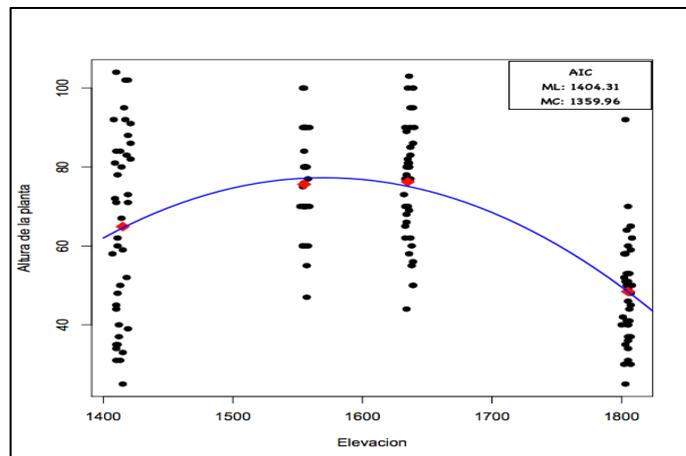


Figura 8. Altura de la especie *Croton* sp. a diferentes niveles altitudinales en un matorral seco en el cantón Catamayo.

3.1.2. Área de la hoja.

Con respecto al área de la hoja, el mejor modelo que se ajusta es el lineal el cual se pudo obtener en base al mejor AIC= 910.63; podemos observar que a medida que aumenta la altitud el tamaño de las hojas disminuye, por lo tanto las hojas mas pequeñas las encontraríamos en la elevación de 1800 m s.n.m con (24,11 mm²). Las hojas de mayor tamaño estarían en la elevación de 1400 m s.n.m con (32,31 mm²).

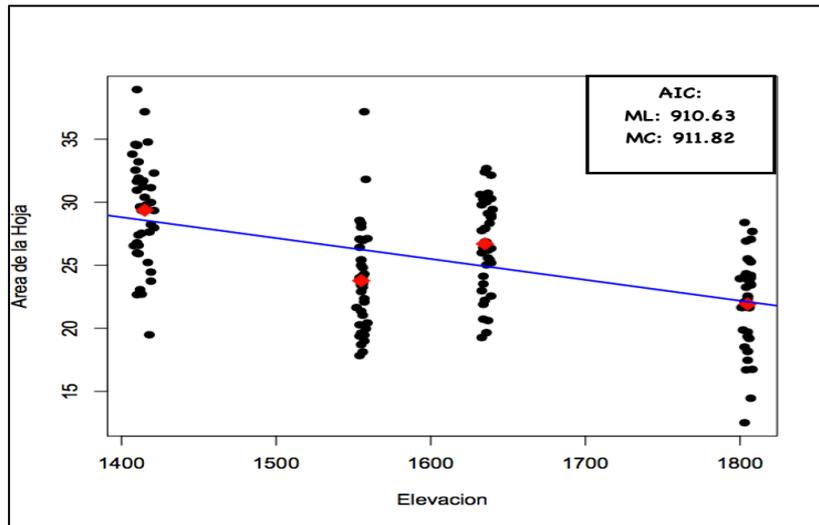


Figura 9. Área de la hoja de la especie *Croton* sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.

3.1.3. Cobertura de la planta.

Con respecto a la cobertura de la planta, el mejor modelo es el cuadrático, el cual se pudo obtener en base al mejor AIC= 679.90, podemos observar que en las elevaciones de 1650 y 1550 m s.n.m se encuentran los individuos de *Croton* sp. que presentan medidas mayores de este rasgo. Las altitudes de 1800 y 1400 m s.n.m indican menor medida de esta variable, lo que nos señala el comportamiento similar entre las elevaciones 1 - 4, y 2 - 3.

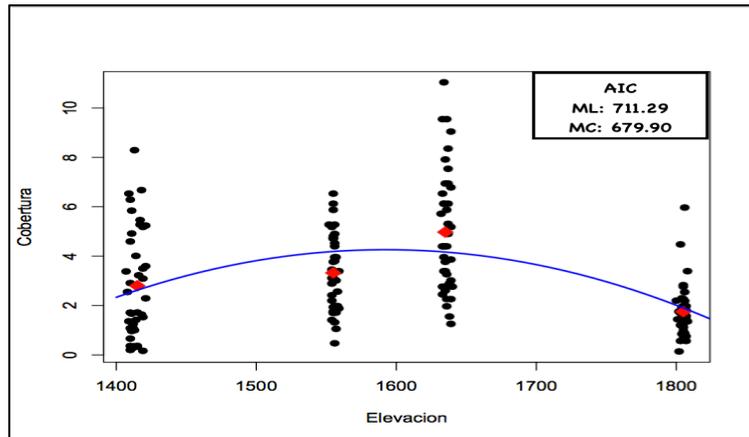


Figura 10. Cobertura de la hoja de la especie *Croton* sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.

3.1.4. Contenido de materia seca (CMS):

En el caso de contenido de materia seca (CMS) el mejor modelo que se ajusta fue el cuadrático, el cual se pudo obtener en base al mejor AIC= -283.78 donde podemos observar que de acuerdo a los puntos medios de los datos ingresados (puntos rojos) las elevaciones de 1550 y 1650 encontramos las plantas con mayor contenido de materia seca, en cambio en las elevaciones 1 y 4 encontramos las plantas con menor CMS.

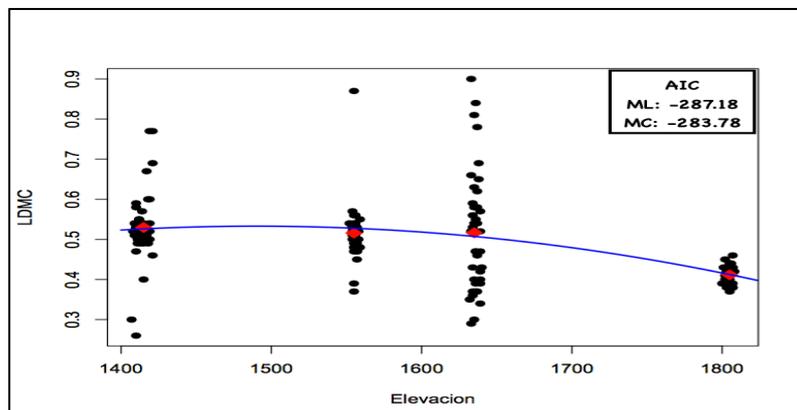


Figura 11. CMS de la especie *Croton* sp. a diferentes niveles altitudinales en matorral seco en el cantón Catamayo.

En el caso de SLA no tuvimos no encontramos significancia en los análisis realizados.

3.2. Genética.

3.2.1. Técnica de AFLP.

De las tres combinaciones de primers usadas se obtuvo un total de 419 alelos, siendo la tercera combinación EcoRI ACA (FAM) + MseI CTT con la que se obtuvo un mayor número de bandas polimórficas 156 alelos.

Tabla 2. Número de loci polimórficos por nivel y porcentaje de polimorfismo.

Nivel msnm	PLP	Número de loci Polimórficos
1400	56,3	236
1550	57,3	240
1700	56,6	237
1800	57,5	241

PLP= proporción de loci polimórficos expresada como porcentaje.

3.2.2. Perfiles AFLP.

Cada electroferograma revelo tamaños moleculares entre los 80-500 pares de bases, sin embargo como se visualiza en la figura 12, la mayor cantidad de perfiles de nuestras muestras están entre los 80 y 240 Pb para los productos PCR de la mayor parte de las combinaciones de primers usadas. Los niveles de fluorescencia emitidos por estos fragmentos alcanzaron intensidades entre los 100 RFU.

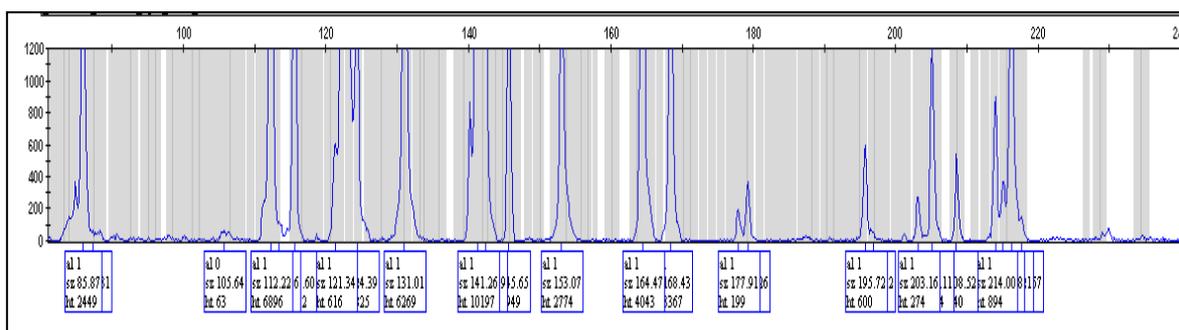


Figura 12. Resultados de GeneMapper de perfiles AFLPs.

3.3. Análisis genético.

Los valores obtenidos de **DW** para *Croton* sp. muestran que las poblaciones que tienen mayor proporción de loci polimórficos son las de la elevación 4 indicando un

valor de 1296,67 lo que nos da una pauta de mayor polimorfismo presente en la elevación de 1800 m s.n.m en comparación con las otras elevaciones de 1400-1500 y 1700 m s.n.m respectivamente. Para expresar el DW en porcentaje promedio realizamos una media de los valores de las 4 elevaciones obteniendo una proporción de loci polimórficos, expresada como porcentaje **PLP= 56,92%**; en las cuatro elevaciones analizadas, siendo la elevación 4 (1800 msnm) la que presenta un mayor porcentaje de **PLP= 57.5%**. Por otra parte podemos ver la heterocigocidad esperada con un valor de **Hj= 0.20617** para cada población lo que nos indica que en la elevación 3 existe un mayor número de individuos que estén compartiendo alelos entre sí. El valor de **Hw** para toda la población fue de 0.1862 indicando el promedio de la diversidad genética en conjunto. La diversidad genética total (**Ht**) fue de 0.8138 valor obtenido de una de las ecuaciones estadísticas de Wright:

$$Ht = 1 - Hw$$

Se calculó el valor de **Fst** con los datos de heterocigosidad en conjunto (Hw, Hj, Ht) el que muestra la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones, por tanto la diferenciación genética entre ellas. Así mismo se puede observar un **Fst de 0,771**, se ha reportado que los valores de Fst cercanos a 1 indicarán que la variación entre las poblaciones va a ser significativa (mayor variabilidad) según los estándares de Wright (1969) creador de los índices F para estudios de genética de poblaciones). En este caso para la población de *Croton* sp. presenta heterogeneidad de media a alta, lo que posiblemente indica que tiene más de una población.

Tabla 3. Parámetros poblacionales obtenidos con los programas AFLP-SURV y STRUCTURE en los individuos muestreados de *Croton* sp. a diferentes altitudes.

Elevación msnm	Pob.	AFLP-SURV				STRUCTURE		
		DW	PLP	Hj	S.E.(Hj)	Hw	Ht	Fst
1400	10	475,24	56,3	0,17077	0,00894	0.1862	0.8138	0.771
1550	10	433,04	57,3	0,18297	0,00909			
1700	10	467,12	56,6	0,20617	0,00912			
1800	10	1296,67	57,5	0,18516	0,00885			
Media			56,92					

DW= proporción de loci polimórficos por nivel; PLP= proporción de loci polimórficos expresada como porcentaje; Hj (He)= o índice de diversidad de Nei, heterocigosidad esperada bajo proporciones genotípicas H-W; S.E. (Hj)= error estándar de Hj; Hw (Hs)= promedio de la diversidad genética dentro de las poblaciones; Ht= diversidad genética total; Fst= diferencia genética entre poblaciones.

3.4. Grupos genéticos.

La diferenciación genética entre poblaciones se realizó en STRUCTURE, en donde se puede observar que el número de subpoblaciones que mejor explicaría el patrón genético presente en la zona evaluada fue de 2 que es el número de grupos genéticos que probablemente existen en las diferentes altitudes, además nos indica que existe flujo genético significativo lo cual genera que las poblaciones de *Croton* sp. puedan intercambiar genes en mayor o menor grado. En las elevaciones 1, 2, y 3 respectivamente se observan los mismo grupos genéticos (A-AB), sin embargo en la elevación 4 (1850 m s.n.m) la presencia de grupos genéticos varía al encontrarse el grupo (AB y B).

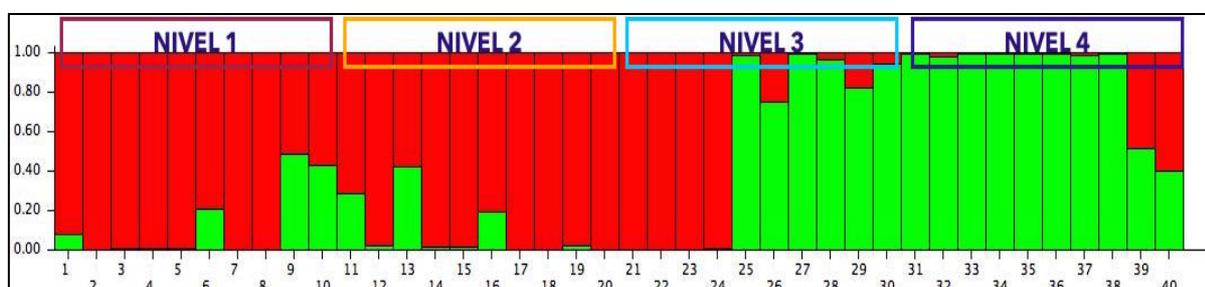


Figura 13. Representación de la estructura poblacional obtenida para las especies de *Croton* sp. colectadas a diferentes niveles altitudinales

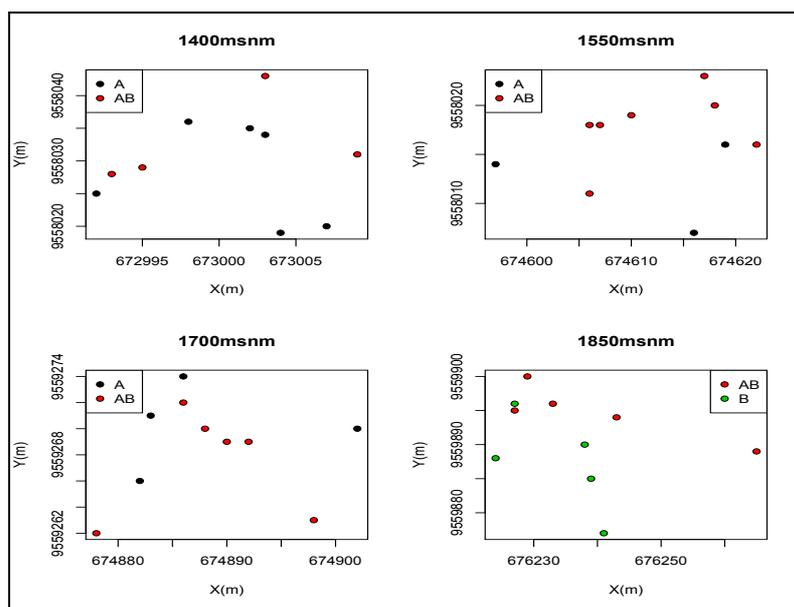


Figura 14. Grupos genéticos presentes en matorral seco en el cantón Catamayo.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN DEL PRIMER OBJETIVO: EFECTO DE LA GRADIENTE ALTITUDINAL EN LA MORFOLOGÍA DE *Croton* sp.

La altitud representa una compleja combinación de condiciones ambientales por lo que ha sido considerada un factor importante que afecta indirectamente la estructura, composición y riqueza de las comunidades vegetales (Malhi et al. 2010), de manera general el número de especies disminuye conforme aumenta la altitud, aunque a veces es mayor la riqueza a altitudes intermedias, probablemente por su condición transicional (Lieberman et al. 1996). La variación morfológica también puede indicar plasticidad fenotípica, como un mecanismo para la adaptación de los organismos ante la heterogeneidad del medio, que se expresa en caracteres relacionados directamente con la adecuación y la evolución bajo condiciones ambientales particulares (Chevin *et al.* 2010). Como vemos estos efectos también pueden verse reflejados en la morfología de la planta, en nuestro caso observamos que las variables morfométricas evaluadas (altura, área de hoja, cobertura y CMS) de la especie se encuentran afectadas por la gradiente altitudinal, indicando que se encuentran compartiendo características (Figura 7). Este efecto puede ser atribuido a que dentro un gradiente altitudinal se generan microambientes que juegan un papel importante en los rasgos de la planta (Santibáñez et al. 2009). Arévalo et al (2012) menciona que el desarrollo de *Croton* sp. está condicionada por factores abióticos de altitud, topografía, precipitación y temperatura que influyen en la altura y área de copa de los individuos de *Croton* sp. La reducción en la altura de las plantas es la mas conspicua alteración morfológica observada a lo largo de gradientes altitudinales, así lo notamos en este estudio en el que las plantas de *Croton* sp. presentan mayor tamaño en los niveles de 1550 y 1650, sin embargo las plantas más pequeñas las observamos en los niveles altitudinales de 1400 y 1800 msnm. Lo que nos da una pauta que en los extremos del gradiente las plantas soportan mayor estrés o competencia por los recursos, siendo afectado el desarrollo de las características en general. En la parte baja podemos atribuir al estrés por agua lo que hace que las plantas limiten en ciertas funciones, en el caso de la parte mas alta es por la competencia que este se puede generar entre las demás especies. El área de la hoja presento con relación a la altitud un decremento de este rasgo en los individuos analizados, siendo las hojas más pequeñas las del nivel de 1800 m s.n.m.

La cobertura de *Croton* sp. también presentó ciertas modificaciones, indicando que en los niveles 2 y 3 (1550 y 1650 respectivamente) encontramos los individuos con mayor cobertura vegetal. Lohengrin (1998) afirma que a mayor medida de Cobertura, en las plantas que actúan como “nodrizas” facilitan el establecimiento de plántulas de otras bajo o entre su dosel, y como sabemos el clima de matorral seco es altamente estresante para la sobrevivencia y reproducción de nuevas plantas (Billings & Mooney 1968), es por ello que en los niveles 1 y 4 que son los extremos las condiciones de estrés hídrico sería más evidente por su topografía y por ello la cobertura sería menor.

Para el cuarto rasgo analizado (CMS) se observa que los niveles de 1550 y 1650 (niveles intermedios) encontramos las plantas con mayor contenido de materia seca, lo que indica una distribución correcta de agua durante el crecimiento de la misma. Resulta un rasgo muy importante de determinar ya que así podremos tener una visión general de la estabilidad hídrica presente en las hojas; en los niveles de los extremos 1 y 4 el CMS disminuye ya sea por una sobreexposición solar lo que causa una mayor pérdida de agua.

En varios estudios de vegetación, en donde han evaluado la altitud frente al comportamiento del desarrollo de algunas especies arbustivas y arbóreas, muestran que los factores como la altura sobre el nivel del mar influye directamente en estas especies, concluyendo que a mayor altura mayor suele ser mejor el crecimiento de las especies vegetales, sin embargo también indican que no siempre sucederá esto, debido a que cada especie obedece a ciertos factores de crecimiento, sean estos genéticos o geoclimáticos, los que influyen en su desarrollo y que por lo tanto también deberían ser evaluados al mismo tiempo con la altitud (Alba-Landa y Romero, 2004).

Como ya se ha mencionado antes, este trabajo contempla una parte del proyecto de Matorral Seco del Departamento de CCNN, por lo que luego de analizar esta variable de altitud donde se tomará en cuenta otros factores adicionales que permitirán una mejor evaluación del desarrollo de *Croton* sp. Estas variables son: la temperatura, la humedad relativa del ambiente, propiedades físicas y químicas del suelo, edad de la vegetación, entre otros con estos parámetros se podrán obtener datos adicionales a los de este estudio de tesis, y así se generará mayor información de la especie *Croton* sp; que cabe mencionar que aún no ha sido estudiada profundamente, y la cual se considera de suma importancia por estar formando remanentes en estas zonas y ser la especie ingeniera del lugar (Espinosa et al. 2012).

EFFECTO DE LA GRADIENTE ALTITUDINAL EN LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE *Croton* sp.

Nuestros resultados sugieren que, dentro de un tipo de vegetación que abarca diferentes gradientes ambientales, tanto, los cambios en la abundancia de especies y la variabilidad de los rasgos intraespecíficos para ajustar la respuesta funcional en comunidad a los cambios ambientales se van a ver afectados a lo largo del gradiente según la especie. (Pescador et al. 2015).

La variabilidad genética encontrada frente a los factores fenotípicos que determinan la variabilidad intraespecífica en la población de *Croton* sp. (Figura 14), indican que la diferencia entre las zonas altitudinales y las características de cada uno de estos sistemas influyo en las plantas, siendo esto comparable con algunos estudios en vegetación como el que presenta Oyervide et al. (1993), el evalúa las diferentes variables ambientales en diferentes zonas e indica que estas variables influyen de manera decisiva en el comportamiento de las plantas y que llegan a mostrar variabilidad entre poblaciones cercanas, lo que influye en épocas de floración, número de flores, altura de planta entre otras. Provervio (2002), también menciona que los factores ambientales como la temperatura, luz, nutrientes del suelo, altura influyen directamente en la variabilidad poblacional, ya que la planta debe adaptarse específicamente a estas variables edafoclimáticas por lo que su fenotipo y genotipo puede variar, dato que concuerda con este trabajo, en el que se observa que parte de la diferencia entre poblaciones para ciertos caracteres ocurre en relación a las modificaciones del medio físico, y por lo tanto se evidencia los efectos de la selección natural (Linhart & Grant 1996). Sin embargo, otras fuerzas evolutivas consideradas neutras como la deriva genética y el aislamiento también pueden explicar en muchos casos el grado de divergencia entre las poblaciones. El flujo genético presente en la zona (fig.15), nos indica que las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sea genes nucleares o genomas uniparentales como la mitocondria o el cloroplasto, este mecanismo es posible gracias al movimiento de semillas de la especie, o vía polen, así lo observamos en los niveles 1-2 y 3 de nuestro estudio en donde la presencia esquematizada de los grupos genéticos (A-AB) es similar. Falush, 2003 sugiere que el flujo genético en las plantas puede actuar como una fuerza evolutiva que mantiene integrada a la especie, además de influir en procesos de persistencia y de adaptación de la misma. En consecuencia, se espera que las especies que habitan gradientes altitudinales posean una estructura genética compleja y una combinación de respuestas adaptativas a las condiciones cambiantes del ambiente (Oleksyn et al. 1998). Sin embargo en el nivel 4 se observa solamente la

presencia de dos grupos genéticos (AB-B), el efecto de las barreras al flujo génico entre poblaciones que habitan de manera continua en gradientes altitudinales, podría sugerir que las poblaciones de mayor altitud son más afectadas por la deriva genética que erosiona el grado de variación genética de las poblaciones. Las frecuencias de los alelos variaron significativamente con la altura, siendo mayor la diferencia entre poblaciones más distantes en el gradiente altitudinal (Premoli, 2003).

Por otra parte cabe señalar que en la especie *Croton* no se han visto registrados otros estudios en la variabilidad genética en el Sur del Ecuador, por lo que no se puede por el momento realizar algún tipo de comparación con respecto a este análisis de variabilidad entre poblaciones a nivel genético. Castillo-Quilano y Domínguez-Torrejón (2010) comentan que en zonas andinas como en el Perú, las poblaciones de *Croton* sp. han sido poco estudiadas y que se debería poner más atención a esta especie que brinda varios beneficios a las personas y ecosistemas en donde se encuentran ubicadas.

CONCLUSIONES

La especie *Croton* sp. muestra variaciones en las características morfológicas, y a nivel genético podemos observar la presencia de dos poblaciones, indicativo de que el gradiente altitudinal ha originado una variabilidad genética intraespecífica entre los individuos de los niveles muestreados; dando a conocer que las agrupaciones se ven mayor relacionadas entre los niveles de 1550 a 1650 m s.n.m., y una segunda en los extremos de 1400 y 1800 m s.n.m.

RECOMENDACIONES

- Continuar con las investigaciones en el sector de Alamala, ya que la especie *Croton* sp. al ser dominante en la zona, resulta muy importante como bioindicador del estado de conservación del hábitat.
- Es necesario ampliar la zona (mas niveles) de estudio y el número de muestras para obtener un panorama más completo de la estructura poblacional y las relaciones genéticas interpoblacionales.
- El estudio de la variabilidad genética debería ser aplicado a otras especies de la zona, ya que revelaría el estado de la población a nivel genético dentro y entre poblaciones.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alba-Landa, J. & Romero, J. (2004). Desarrollo de Fuentes Parentales de *Pinus patula* Schl. et cham. en un Rango Altitudinal. México.
- Aguirre, Z. & Kvist, P. (2005). Floristic composition and conservation status of the dry forests in Ecuador. *Lyonia a journal of ecology and application*. Volumen 8(2).
- Aguirre, Z., Linares-Palomino, R. & Kvist, P. (2006). Especies leñosas y formaciones vegetales en los bosques estacionalmente secos de Ecuador y Perú. *Arnaldoa*. Volumen 13(2). pp 324-346.
- Applied Biosystems. (2010). AFLP Plant Mapping Protocol. Obtenido de https://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040959.pdf.
- Arriaga, L., Y. Maya, S. Diaz & J. Cancino. (1993). Association between cacti and nurse perennials in a heterogeneous tropical dry forest in northwestern Mexico. *J. Veg. Sci.* 4: 349-356.
- Arnao, E. Jayaro, Y. Hinrichsen, P. Ramis, C. Marín, C. y Pérez-Almeida, I. (2008). Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas elites de arroz en Venezuela. Comunicaciones.
- Benavides, M.A. (2002). "Ecofisiología y química del estrés en plantas", Departamento de agricultura/UAAAN.
- Billings WD & Mooney H. (1968) The ecology of arctic and alpine plants. *Biological Review* 43:481-520.
- Bugarin-Montoya, R., A. Glavis-Spinola, P. Sanchez-Garcia & D. García-Paredes. (2002). Acumulación diaria de materia seca y de potasio en la biomasa aérea total del tomate. *Terra* 20(4):401-409.
- Burke, A. (2003). How special are Etendeka mesas? Flora and elevation gradients in an arid landscape in north-west Namibia. *J. Arid Environ.* 55: 747-764.
- Carlquist S. 1977. Ecological factors in wood evolution: a floristic approach. *American Journal of Botany* 64: 887-896.
- Castillo-Quiliano, A. & Domínguez-Torrejón, G. (2010). Evaluation of the "dragon's blood" (*Croton lechleri*) latex production, taking into consideration its diameter and four periods of rainfall in natural populations from Ucayali, Perú. *Ecología Aplicada* 9 (2). ISSN 1726-2216.
- Cornejo, O.E. (2002). "Factores ambientales que originan el estrés. Ecofisiología y química del estrés en plantas", Departamento de agricultura/ UAAAN.
- Cornelissen, J. H. C., S. Lavorel, E. Garnier, S. Diaz, N. Buchmann, D. E. Gurvich, P. B. Reich, H. Ter Steege, H. D. Morgan, M. G. A. van der Heijden, J. G. Pausas, & H. Poorter. (2003). A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51:335-380.
- Cuevas, JG. (2000). Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Ecology* 88:840-855.

- Chase, M. & Hills, H. (1991). Silica gel: an ideal material for field preservation of leaf samples for DNA studies. pp. 215-220.
- Chapin, F.S., III, E. Zavaleta, V. Eviner, R. Naylor, P. Vitousek, H. Reynolds, D. Hooper, S. Lavorel, O. Sala, S. Hobbie, M. Mack & S. Díaz. (2000). Consequences of changing biodiversity. *Nature* 405: 234 – 242.
- Díaz, S. & M. Cabido. (2001). Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Ecology & Evolution* 16(11): 646 – 645.
- Díaz, S., J.G.Hodgson, K.Thompson, M. Cabido, J.H.C. Cornelissen, A.Jalili, G. Montserrat. Martí, J.P. Grime, F. Zarrinkamar, Y.Asri, S.R. Band, S. Basconcelo, P. Castro Díez, G. Funes, B. Hamzehee, M.Khoshenevi, N. Pérez Harguindeguy, M.C. Pérez Rontomé, F.A. Shirvany, F. Vendramini, S. Yazdanim R. Abbas Azimi, A. Bogaard, S. Boustani, M. Charles, M. Dehghan, L. de Torres Espuny, V.Falczuk, J. Guerrero Campo, A.Hynd, G.Jones, E.Kowsary, F.Kazemi Saeed, M. Martínez, A. Romo Díez, S. Shaw, B. Siavash, P. Villar Salvador & M.R. Zack. 2004. The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* 15:295 – 304.
- Dinerstein, E., D. M. Olson, D. J. Graham, A. L. Webster, S. A. Primm, M. P. Bookbinder, and G. Ledec. (1995). A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean. Page 129 WORLD BANK WASHINGTON DCUSA 1995. World Bank. doi: 10.1596/978-0-8213-3295-5.
- Dodson, C. & A. Gentry, Biological extinction in western Ecuador. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1991. 78: pp. 273-295.
- Durlo, M.A. (2001). Relações morfológicas para *Cabralea canjerana* (Willd.) Mart. *Ciencia Florestal* 11(1):141-149.
- Espinosa, C.I., O. Cabrera, A. Escudero, and A. Luzuriaga. (2011). What Factors Affect Diversity and Species Composition of Endangered Tumbesian Dry Forests in Southern Ecuador. *Biotropica* 43:15-22.
- Espinosa, C.I., de la Cruz, M.; Luzuriaga, A.L.; Escudero, A. (2012). Bosques tropicales secos de la región Pacífico Ecuatorial: diversidad, estructura, funcionamiento e implicaciones para la conservación. *Ecosistemas*, vol. 21, núm. 1-2, pp. 167-179.
- Evanno, G., S. Regnaut & J. Goudet. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611-2620.
- Falster, DS; Westoby, M. (2003). Plant height and evolutionary games. *Trends in Ecology and Evolution*. 18(7): 337-343.
- Falush, D., M. Stephens y J. K. Pritchard. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164:1567-1587.
- Garnier, E., B. Shipley, C. Roumet, and G. Laurent. (2001). A standardized protocol for the determination of specific leaf area and leaf dry matter content. *Funct. Ecol.* 15: 688-695.
- Gómez, J.D, Monterroso, A.I., Tinoco, J.A. (2007). Distribución de cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) en el estado de Hidalgo, bajo condiciones actuales y escenarios de cambio climático. *Madera y Bosques* 13(2):29-49.
- Guarente, L, G. Ruvkun and R. Amasino.(1998). Aging, life span, and senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95(13):11034-11036.
- Jorgensen, P.M. & León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri, USA*. pp 1181.

- Kofidis G., Bosabalidis A.M. y Moustakas M. 2003. Contemporary seasonal and altitudinal variations of leaf structural features in Oregano (*Oregarum vulgare* L.). *Annals of Botany* 92: 635-3645.
- Körner, C. (2003). *Plant Alpine Life*. Springer-Verlag, Berlin.
- Lin, J., Sampson, D.A., Deckmyn, G.; Ceulemans, R. (2002). Significant overestimation of needle surface area estimates based on needle dimensions in Scots pine (*Pinus sylvestris*). *Canadian Journal of Botany* 80: 927-932.
- Linhart, YB & Grant, MC. (1996). Evolutionary Significance of Local Genetic Differentiation in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27:237-277.
- Lozano, P. (2002). Los tipos de bosque en el sur de Ecuador. pp 29-49 En: Aguirre, Z., Madsen, J.E., Cotton, E. & Balslev, H. (eds.). *Botánica Austro ecuatoriana. Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*. Abya Yala. Ecuador.
- Funes, G. & Cabido, M. (1995). Variabilidad local y regional de la vegetación rupícola de las Sierras Grandes de Córdoba, Argentina. *Kurtziana* 24: 173-188.
- Molina-Montenegro M.A. y Cavieres L.A. 2010. Variación altitudinal de los atributos morfo-fisiológicos en dos especies de plantas alto- andinas y sus implicaciones contra la fotoinhibición. *Gayana Botánica* 67: 1-11.
- Mueller, U., & Wolfenbarger, L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology & evolution*, 14(10), 389–394. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10481200>.
- Oleksyn, J., Tjoelker B & Reich P. (1998). Adaptation to changing environment in Scots pine populations across a latitudinal gradient. *Silva Fennica* 32:129-140.
- Oyervides, A., Mariaca, J., De León, H., y Reyes M. (1993). Estimación de parámetros genéticos en una población de Maíz tropical. *Agronomía Mesoamericana* 4: 30-35.
- Peña, D., (2002). *Regresión y Diseño de Experimentos*. Alianza Editorial.
- Pescador, D.S, de Bello F, Valladares F, Escudero A (2015). Plant Trait Variation along an Altitudinal Gradient in Mediterranean High Mountain Grasslands: Controlling the Species Turnover Effect. *PLoS ONE* 10(3).
- Premoli, A. (2003). Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity* 94:218-226.
- Premoli, A & Mathiasen P. (2011). Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acaparó los Andes australes. *Ecología Austral* 21:251-269.
- Pritchard, J., Stephens, M., Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 155:945-959.
- Proverbio, F. (2002). *Biología*. Editorial Santillana. Caracas-Venezuela.
- Puerta, C. & Urreña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular*. Editorial Pontifica Universidad Javeriana. pp1 – 100.
- Richter, M., and A. Moreira-Muñoz. (2005). Heterogeneidad climática y diversidad de la vegetación en el sur de Ecuador : un método de fitoindicación. *Rev. Perú. biol.* 12:217- 238.
- Rundel, P., Smith, A., Meinzer, F. (1994). *Tropical Alpine Environments*. Cambridge University Press, UK.

- Savelkoul, P. H. M., Arrts, H. J. M., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L. W., Schouls, L., y Lenstra, J. A. (1999). Amplified-Fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *J Clin Microbiol*, 37 (10): 3083-3091.
- Shipley, B. and T-T. Vu. (2002). Dry matter content as a measure of dry matter concentration in plants and their parts. *New Phytol.* 153: 359-364.
- Slatkin, M. y N.H. Barton. (1989). A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43:1349-1368.
- Valencia, R., Cerón, C., Palacios, W. & Sierra, R. (1999). Las formaciones naturales de la Sierra del Ecuador. pp 79-108. En: Sierra, R. (Ed). (1999). Propuesta Preliminar de un Sistema de clasificación de Vegetación para el Ecuador Continental. Proyecto INEFAN/GEF- BIRF y EcoCiencia. Quito, Ecuador.
- Valencia, R., Pitman, N., León-Yáñez, S. & Jorgensen, P. (2000). Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Ecuador. Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Violle, C., M. Navas, D. Vile, E. Kazakou, C. Fortune, I. Hummel & E. Garnier. (2007). Let concept of trait be functional. *Oikos*. 116: 882 – 892.
- Webster, G.L. (1993). A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). *Taxon* 42. 793-823.

ANEXOS

ANEXO 1. EXTRACCIÓN DE ADN QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit)

La extracción y purificación del ADN de las diferentes muestras del género *Croton* se llevó a cabo aplicando el siguiente protocolo:

- a) Calentar el bloque a 65° y colocar el bufer AE según la cantidad de muestras (100ul por c/u).
- b) Colocar los tubos y etiquetarlos.
- c) triturar las muestras (igual o menor de 100mg peso frasco). Las muestras pueden ser trituradas con nitrógeno líquido, sobre todo en el caso de material fresco o con el molino de trituración, en este caso el material vegetal debe estar seco.

Paso de extracción

1. Colocar 400ul de Buffer **AP1+4ul** de **RNAase A**. Dar vórtex e incubar por 10 min a 65°C (mover los tubos cada 2 min) en el mismo tubo.
2. Adicionar 130ul de **buffer P3** y mezclar por pipeteo o vórtex (en el mismo tubo). Incubar por 5 minutos en hielo.
3. Centrifugar el lisado por 5 minutos a 14.000 rpm o 20000 Xg (o hasta que se haya formado bien el pellet, centrifugar por menos tiempo en caso de ser necesario).
4. Transferir el lisado (sobrenadante) a una columna de color lila con tubo, con la ayuda de una pipeta
5. Centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm o 20000 Xg.
6. Transferir el sobrenadante del paso anterior a un nuevo tubo con tapa sin que se altera el pellet (eliminar el tubo con pellet), se recupera aproximadamente 450ul si es mejor se calcula su volumen para el siguiente paso.
7. Añadir 1.5 vol de buffer **AW1** y mezclar por pipeteo (ej. 450Ul equivale a 675µl, (puede ser 700µl).
8. Transferir los 650 µl del paso anterior en una columna de color blanco con un tubo influyendo cualquier precipitado y centrifugar por 1 min a 8000 rpm o 600 Xg, deseche el sobrante o lo que se encuentre en el tubo.

9. Repetir el paso anterior (8) con el líquido restante del paso 9 y al final desechar el sobrante del tubo.
10. Colocar en nuevo tubo sin tapa la columna blanca añadiendo 500ul de **buffer AW2** y centrifugar por un minuto a 8000 rpm (desechar el sobrenadante del tubo)
11. Adicione nuevamente 500ul de Buffer **AW2** per centrifugue por dos minutos a 14000 rpm (desechar al sobrenadante del tubo).
12. Volver a centrifugar por 2 minutos a 14000 rpm (deseche el sobrenadante del tubo).
13. Transfiera la columna blanca (con membrana) a un nuevo tubo con tapa y adicione a la membrana 50ul de **AE** (calentado previamente al inicio del proceso), e incube por 5 minutos a temperatura ambiente.
14. Centrifugue por 1 minuto a 8000 rpm.
15. Añadir nuevamente 50ul de **AE** (caliente).
16. Centrifugar por un minuto a 8000rpm.
17. Descarte la columna blanca (con membrana) y reserve el líquido de ADN, que debe estar conservada a -20°C, correctamente etiquetado.

ANEXO 2. PROTOCOLO AFLPs-*Croton sp.*

A.

1. Temperar los pares de adaptadores MseI y EcoRI.
2. Permitir que los tubos se enfríen a temperatura ambiente durante 10 min, cubiertos de papel aluminio.
3. Poner en la microcentrifuga durante 10 segundos

B. MÁSTER MIX

REACTIVO	1 M (μ L)
T4 DNA ligasa buffer	0.05
NaCl 0.5M	0.05
BSA	0.025
ECORI (enzima)	0.125
MSEI (enzima)	0.05
T4 DNA ligasa	0.0165
Agua destilada estéril	0.1835

- Añadir agua destilada estéril UP hasta alcanzar un volumen total de 100 μ L
- Mezclar suavemente
- Centrifugar por 10 segundos
- Almacenar en hielo hasta su uso
- Para mejores resultados utilizar 1-2 horas después.

C. RESTRICCIÓN-LIGACIÓN

REACTIVO	1 M (μ L)
T4 DNA ligasa buffer	0.5
NaCl 0.5 M	0.5
BSA	0.25
MseI adaptador	0.5
EcoRI adaptador	0.5
Enzyme master mix	0.5
DNA	2.5

- a. Centrifugar durante 10 segundos
- b. Incubar a temperatura ambiente, utilizar el termociclador (no calentar la tapa).

D. DILUCIÓN DE LAS REACCIONES RESTRICCIÓN-LIGACIÓN

- Añadir 90 μL de agua destilada estéril para cada reacción de restricción-Ligación
- Mezclar bien
- Almacenar a 2-6 ° C durante un máximo de 1 mes.

E. AMPLIFICACIÓN PRESELECTIVA

Mantener todos los reactivos en hielo hasta colocar en el termociclador. .

Almacenar a 2-6 ° C después de la amplificación.

Realizar la PCR con las siguientes condiciones.

REACTIVO	1 M (μL)
DNA diluido en cada tubo	1.34
PRIMERS	0.34
CORE MIX	5

F. PREPARACIÓN DE LA PLANTILLA

HOLD	CYCLE 20 ciclos			HOLD	HOLD
72 °C 2 min.	94 °C 20 sec.	56 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	60 °C 30 min.	4 °C (forever)

- Añadir agua destilada estéril, según los cálculos realizados. (45 μL)
- Combine la siguiente reacción en un tubo de PCR estéril
- Centrifugar por 10 segundos
- Almacenar a 2-6 ° C si no va a usar inmediatamente.

G. AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Combine la siguiente reacción en un tubo de PCR estéril

REACTIVO	1M (μL)	Combinación Primers utilizados
Reacción de amplificación preselectiva	1	ACA X CAC (A)
MseI (primer)	0.33	ACA X CTC (B)
EcoRI (primer)	0.33	ACA X CTT (C)
Core Mix	5	

- Correr la PCR usando los siguientes parámetros
- Almacenar a 2-6 ° C después de la amplificación.
- Cubrir con papel aluminio al salir del termociclador.

HOLD	CYCLE			NUMBER OF CYCLES
94 °C 2 min.	94 °C 20 sec.	66 °C 30 sec.	72 °C 2 min.	1
		65 °C 30 sec.		1
		64 °C 30 sec.		1
		63 °C 30 sec.		1
		62 °C 30 sec.		1
		61 °C 30 sec.		1
		60 °C 30 sec.		1
		59 °C 30 sec.		1
		58 °C 30 sec.		1
		57 °C 30 sec.		1
		56 °C 30 sec.		20
		60 °C 30 min.		60 °C 30 min.
4 °C (forever)	4 °C (forever)	-		1