

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



VARIABILIDAD GENÉTICA EN CUATRO POBLACIONES
DE *Quercus skinneri* Benth (FAMILIA FAGACEAE) EN EL SALVADOR.

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

LIGIA ELENA MUÑOZ MOLINA

ROBERTO ANTONIO NAVARRO LINARES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, 02 DICIEMBRE DE 2022

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN:
VARIABILIDAD GENÉTICA EN CUATRO POBLACIONES
DE *Quercus skinneri* Benth (FAMILIA FAGACEAE) EN EL SALVADOR.

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

ASESOR:
M.Sc. MIGUEL ÁNGEL MORENO MENDOZA



SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, 02 DICIEMBRE DE 2022

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

LIGIA ELENA MUÑOZ MOLINA

ROBERTO ANTONIO NAVARRO LINARES

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

TRIBUNAL EVALUADOR:

DR. CELSO CORTÉS ROMERO



MSc. CARLOS GIOVANNI RIVERA



SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, 02 DICIEMBRE DE 2022

AUTORIDADES UNIVERSITARIAS

RECTOR ACADÉMICO

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS

VICERRECTOR ACADÉMICO

DR. RAÚL AZCÚNAGA

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO

ING. JUAN ROSA QUINTANILLA

SECRETARIO GENERAL

ING. FRANCISCO ALARCÓN

FISCAL

LIC. RAFAEL HUMBERTO PEÑA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS

DECANO

LIC. MAURICIO HERNÁN LOVO

VICE DECANO

M.Sc. ZOILA VIRGINIA GUERRERO

SECRETARIO

LIC. JAIME HUMBERTO SALINAS ESPINOSA

DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA

M.Sc. ANA MARTHA ZETINO

SAN SALVADOR, CIUDAD UNIVERSITARIA, 02 DICIEMBRE DE 2022

DEDICATORIA

A mi familia que me apoyo durante toda la carrera.

Ligia Muñoz.

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá Frida Molina por todo el amor, apoyo y regañarme cuando casi tiro la toalla antes de egresar de la carrera. A mi papá Jorge Muñoz por el cariño, siempre buscar darme lo mejor y por todo el esfuerzo y trabajo. A mi hermana Frida Muñoz por existir y ser ella. A la Cleo por ser mi perro de apoyo emocional. Al resto de mi familia por preguntarme constantemente cuando iba a terminar la tesis.

A mis amigos, Roberto Navarro quien a este punto se ha convertido en un hermano, por el cariño, ser mi compañero en muchas locuras incluyendo la tesis, por acompañarme, apoyarme y ser la voz de la razón en varias crisis existenciales en el proceso. A Sonia López por todo el apoyo, cariño y muchas aventuras divertidas. A Rafael Salazar, Néstor Ruballo, Milagro Salinas y Fernando Merino por acompañarnos en campo y por el chambre que nunca falta. Al Lic. Gabriel Cerén del Museo de Historia Natural y Lic. Carlos Elías por acompañarnos en campo.

A nuestro asesor Miguel Moreno por los conocimientos que nos impartió a lo largo de la carrera, levantar el laboratorio de biología molecular de la Escuela de Biología, rebuscarse para que en medio de una pandemia pudiéramos terminar nuestra tesis, y por siempre creer en nosotros y apoyarnos en todo.

Ligia Muñoz

DEDICATORIA

A la persona que me enseñó a amar los cerros y los celajes, gracias por todo mamá Ena.

Roberto Navarro.

AGRADECIMIENTOS.

A mi madre, Silvia Linares, por siempre cuidarme, quererme y apoyarme en cada proyecto que emprendo en mi vida. A mi hermano, Rodrigo Navarro, por ser mi compañero de peleas y alegrías desde que nací. A mis queridos hermanitos, Wilber y Belén, por preocuparse por mí y llenarme la vida de alegrías. A mis tíos, Eni, Iris y Chico, por apoyarme y aconsejarme a lo largo de la carrera.

A Ligia Muñoz, por regalarme su amistad incondicional, por acompañarme en los momentos más difíciles que he enfrentado, por aguantarme como compañero y haber hecho de esta investigación algo disfrutable y posible. A Sonia López, por brindarme su gran amistad, darme sus consejos y regaños cuando han sido necesarios, hacer divertidos los laboratorios, por estar ahí y ayudarme a salir adelante. A Néstor Ruballo, por haberme guiado y aconsejado como biólogo, y seguirlo haciendo como biólogo y amigo. A los Rafas (Grande y Claros), por ser mis compinches de laboratorio y tiburones. A Fernando Merino, por compartir su amistad y su amor por los robles. A Fanny Arias y Arnold Marroquín, por los momentos que pasamos.

Al Herbario del Museo de Historia Natural, especialmente al Lic. Gabriel Cerén, por compartir su conocimiento, hacer preguntas complicadas, acompañarnos al volcán y siempre brindarnos más ayuda y apoyo del que considerábamos posible. Al Lic. Carlos Elías y Licda. Milagros Salinas, por acompañarnos en las colectas de campo.

A la Dra. Vianney Castaneda, por aceptarme en su laboratorio, contagiarme su pasión por la investigación e innovación, compartir los secretos del cacao y permitirme equivocarme para crecer como profesional.

A nuestro docente y asesor, Miguel Ángel Moreno, por creer en mí desde que fui su estudiante, brindarme su confianza y las herramientas necesarias para poder desarrollarme, por el gran esfuerzo puesto en la mejora del Laboratorio de Biología Molecular de la Escuela de Biología, por rebuscarse para que tuviéramos todos los equipos, reactivos y permisos necesarios para completar esta investigación, y por todas las charlas, ideas, correcciones, consejos y palabras de apoyo que nos brindó siempre, gracias infinitas Lic.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVOS	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos	4
MARCO TEÓRICO.....	5
Antecedentes	5
Biología del género <i>Quercus</i>	7
Ciclo de Vida	8
<i>Quercus skinneri</i> Benth.....	9
Clasificación taxonómica.....	9
Descripción botánica.....	9
Distribución.....	11
Genética de poblaciones	12
Variabilidad genética	12
Variabilidad genética neutral y adaptativa.....	12
Deriva Genética	13
Teoría de coalescencia	13
Estructura Poblacional	13
Código de barras de ADN.....	14
METODOLOGÍA	15
Descripción del sitio de estudio	15
Parque Ecoturístico Las Cascadas de Don Juan, Ahuachapán.	15
Laguna de las Ninfas, Ahuachapán.....	16
Parque Nacional Cerro Verde, Santa Ana.....	16
Volcán de San Vicente, Finca Santa Margarita.	16
Metodología de campo.....	16
Recolecta de muestras	16
Metodología de laboratorio.....	17
Ubicación del laboratorio.....	17

Extracción del ADN.....	18
Determinación de la integridad del ADN.	18
Amplificación de la región ITS2 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	19
Secuenciación de los productos de PCR.....	20
Procesamiento de las secuencias.....	20
Alineamiento de las secuencias	21
Análisis estadístico.....	22
Análisis de diversidad genética.....	22
Diversidad nucleotídica	22
Diversidad y frecuencia haplotípica.....	22
Estructura genética.....	23
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	23
Comparación por pares de los índices de distancias genéticas.	23
Flujo genético.....	25
Aislamiento por distancia	26
Mapa de haplotipos	26
Mapa filogenético	26
RESULTADOS.....	27
Extracción y amplificación del ADN de las muestras.	27
Procesamiento y alineamiento de las secuencias.	27
Índices de la diversidad genética.	27
Estructura genética.....	28
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	28
Comparación por pares de los índices de distancias genéticas.	28
Flujo genético.....	30
Aislamiento por distancia	31
Mapa de haplotipos	32
Árbol filogenético.	33
DISCUSIÓN	35
Índices de diversidad genética.	35
Diversidad nucleotídica y haplotípica.....	35
Estructura genética.....	36

CONCLUSIONES	40
RECOMENDACIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA	42
ANEXOS.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración y cantidades de los componentes necesarios por reacción de 25 μ L	19
Tabla 2: Detalles de la programación del termociclador para la PCR del gen ITS2.	20
Tabla 3: Distribución de las secuencias según sitio de muestreo e índices de diversidad genética.	27
Tabla 4: Comparación del porcentaje de variación entre poblaciones y adentro de las poblaciones, con sus grados de significancia.	28
Tabla 5: Valores FST y número de migrantes (M) entre poblaciones.	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Especímenes herborizados de <i>Quercus skinneri</i> Benth.	11
Figura 2: Mapa de distribución de <i>Quercus skinneri</i> Benth.	11
Figura 3: Ubicación geográfica de la distribución de los sitios de muestreo.	15
Figura 4: a) Colecta de muestras en campo, b) Prensado de las muestras vegetales, c) Muestra herborizada.	17
Figura 5: a) Digestión del material vegetal pulverizado, b) Precipitación del ADN, c) Realización de electroforesis del ADN extraído.	18
Figura 6: Visualización de los electroferogramas resultantes de la secuenciación por electroforesis capilar en el software SnapGene®.	21
Figura 7: a) Representación gráfica del FST por pares de poblaciones, b) Representación gráfica de FST coalescente por pares de población.	29
Figura 8: Representación gráfica de las distancias de Nei netas entre poblaciones (en verde), dentro de las poblaciones (en rojo) y la Distancia de Nei (en azul).	30
Figura 9: Gráficas de la prueba de Mantel.	32
Figura 10: Mapa de los haplotipos	32
Figura 11: Árbol filogenético	34

RESUMEN

La pérdida y fragmentación de bosques es una realidad a la que se ha enfrentado El Salvador desde tiempos históricos, en este caso, los bosques de pino-encino, bosque nuboso y bosques de encino donde se encuentra *Quercus skinneri* Benth. y varios de los representantes del género *Quercus* generalmente a una altura de más de 1,000 m.s.n.m., estos han sido remplazados para la siembra de café y para la construcción de viviendas, disminuyendo así su hábitat actual y haciendo posible la disminución de su diversidad genética. Con el objetivo de conocer la diversidad y estructura genética de *Q. skinneri* Benth. se analizaron 37 secuencias de ADN extraído a partir de hojas de árboles adultos, pertenecientes a 4 poblaciones diferentes, siendo este el primer estudio que utiliza herramientas de secuenciación en árboles de El Salvador. Se encontró diversidad genética alta en todas las poblaciones ($\pi = 0.00576 - 0.01241$) ($Hd = 0.866 - 1.00$), el valor más alto se presentó en la población del Volcán de San Vicente. Las poblaciones se encuentran estructuradas en dos grupos según el índice de diferenciación genética, los valores fueron significativos solo al comparar con la población de San Vicente ($F_{ST} = 0.657 - 0.680$); las poblaciones de Las Cascadas de Don Juan, Laguna de las Ninfas, y Cerro Verde conforman una sola población genéticamente ($F_{ST} = -0.022 - 0.056$) compartiendo la mayoría de sus haplotipos ($h = 9$), mientras que el otro grupo está conformado solamente por la población del Volcán de San Vicente ($h = 5$), estos resultados concuerdan con los valores obtenidos de flujo genético y aislamiento por distancia. Estos resultados indican que *Q. skinneri* Benth. tiene la capacidad de mantener conexión reproductiva a largas distancias por su reproducción anemófila, disminuyendo los efectos de la fragmentación en sus poblaciones, sin embargo, a distancias que exceden el alcance de dispersión de polen se logra observar diferenciación genética.

INTRODUCCIÓN

El Salvador, al ser parte del istmo centroamericano, posee una ubicación privilegiada desde el punto de vista biológico, ya que, esta región se ve influenciada por la biota de Norte y Sur América, esto, sumado a su posición en el trópico y su accidentado relieve, permite que en el país exista una alta diversidad de formas de vida, las cuales se han visto presionadas a lo largo de la historia por distintos grupos humanos, desde la época precolombina, hasta la actualidad. Esta alta presión antrópica causada por la elevada densidad poblacional ha llegado a tal grado que ha alterado el 98% de la cobertura vegetal originaria de El Salvador (Dull, 2008).

A nivel centroamericano, se consideran a los bosques de pino-encino como una de las áreas boscosas más vulnerables, de los cuales, en época reciente y según la Alianza para la Conservación de los Bosques de Pino-Encino de Mesoamérica (2008), solo queda un remanente del 26% del área total que cubría históricamente, y se pronostica que en 30 años esta podría desaparecer en su totalidad. Para El Salvador se reportan dieciséis especies del género *Quercus* L., siendo éstas en su mayoría especies representantes de la vegetación de tierra templada y fría, distribuyéndose en alturas desde los 800 a los 2,700 m.s.n.m., (Muller, 1942). Lauer (1954) describe que el uso desmedido e irresponsable de los recursos naturales ha diezmando los rangos de distribución de estas especies, principalmente al remplazarse la vegetación originaria por cafetales, llegando al punto de estar presente en menos del 4% del territorio nacional, según el Inventario Nacional de Bosques (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales 2018)

Este alto grado de fragmentación produce un impacto negativo en la diversidad genética de las especies, lo que ocasiona una mayor vulnerabilidad a los constantes cambios abióticos y bióticos, debido a que presentan una menor probabilidad de entrecruzamiento de individuos, aumento en la homocigosis y disminuyendo la diversidad genética de las poblaciones, lo que a su vez disminuye el potencial de adaptación evolutiva (Frankham et al., 2012). Considerando esto, la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza recomienda la conservación de la biodiversidad en tres niveles: genética, de especies, y de diversidad ecosistémica (McNeely et al., 1990).

Enfocándose en la primera, se decidió estudiar la variabilidad y estructura genética de *Quercus skinneri* Benth., determinando la diversidad haplotípica y nucleotídica, índices de fijación, flujo

genético, aislamiento por distancia y relaciones filogenéticas en las poblaciones de esta especie de roble, la cual, se encuentra distribuida en El Salvador, encontrándose en 7 departamentos, entre altitudes de 700 a 2,100 m.s.n.m. Para ello se recolectaron 40 muestras de tejido foliar perteneciente a árboles adultos, de las cuales se purificó, amplificó y secuenció la región de ADN ribosomal ITS2. Con estos datos se determinaron los índices de diversidad genética S , π y H_d (número de sitios segregantes, diversidad nucleotídica y diversidad haplotípica, respectivamente), así como la estructura genética mediante el Análisis de Varianza Molecular, Comparaciones por pares de los índices F_{ST} , $F_{ST,coal}$ D y Da y la representación gráfica de está construyendo un mapa de haplotipos y un árbol filogenético. A su vez, se puso a prueba la relación entre distancia genética y geográfica mediante la prueba de Mantel.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Determinar la variabilidad genética de cuatro poblaciones de *Quercus skinneri* Benth. ubicadas en los departamentos de Ahuachapán, Santa Ana, y San Vicente mediante el análisis de la región ITS2.

Objetivos específicos

1. Determinar la diversidad nucleotídica y haplotípica de las secuencias de la región ITS2 de cuatro poblaciones de *Quercus skinneri* Benth.
2. Determinar la estructura genética en las cuatro poblaciones de *Quercus skinneri* Benth. mediante el análisis de los índices de diversidad genética.
3. Establecer relaciones filogenéticas de las secuencias del gen ITS2 pertenecientes a las cuatro poblaciones en estudio de *Quercus skinneri* Benth.

MARCO TEÓRICO

Antecedentes

En los últimos años las herramientas moleculares han demostrado ser muy eficientes y eficaces para responder un gran número de preguntas en los ámbitos de la taxonomía, filogenética, conservación y análisis de variabilidad genética (Altamirano y Yáñez, 2016).

Los estudios genéticos realizados en la región han ayudado a comprender el comportamiento de los bosques de cara a la fragmentación con el estudio de especies prioritarias para la conservación o que poseen estrategias de reproducción y de manejo específicas. En 2004 Alfonso-Corrado y colaboradores llevaron a cabo un estudio de la diversidad genética de *Quercus eduardi* Trel. y *Q. potosina* Trel., tanto a nivel poblacional como de conjuntos clonales, donde, por medio de marcadores RAPDs, encontrando una alta diversidad genética en las poblaciones, con estructuración poblacional baja, lo que concuerda con los valores de flujo genético altos observados en ambas especies. Los autores comentan que esto es normal para especies que se reproducen por medio de clones vegetativos, sin embargo, estas poblaciones mostraron diversidad genética mayor que otras especies clonales, se atribuyó esta gran diversidad a las estrategias reproductivas propias del género, así como también, a la capacidad de estas especies de reproducirse vegetativamente y su amplia distribución por la Sierra Fría mexicana.

En cuanto a especies prioritarias para la conservación, Paz (2012) estudió la variabilidad y estructura genética de cuatro poblaciones de *Q. humboldtii* Bonpl. en los Andes colombianos, para la elaboración de estrategias de conservación, ya que, esta es una especie endémica en estado vulnerable. Los resultados mostraron que las poblaciones estudiadas presentan niveles bastante similares de variabilidad genética que la autora determina como variación genética intermedia, sin embargo, sí se encontró estructuración poblacional, atribuyéndose a la fragmentación del paisaje ocurrida en tiempos recientes. La autora recomienda llevar a cabo programas de reforestación local si el objetivo es mantener las diferencias genéticas encontradas en los fragmentos.

Por su parte, Ortego et al. (2015) analizaron poblaciones periféricas de *Q. segoviensis* Liebm. en Nicaragua, combinando la información obtenida a partir de microsatélites nucleares y el modelamiento de nicho para conocer los factores que rigen la estructuración de la variabilidad genética de dichas poblaciones, haciendo una comparación entre la estabilidad del hábitat local, el

clima y los datos genéticos. Ellos encontraron que la variabilidad genética de estas poblaciones se ha visto afectada solamente por el aislamiento geográfico y el bajo flujo genético entre las poblaciones. Con respecto a la comparación con el modelamiento de nichos, concluyeron que la estabilidad del nicho y el clima presente y pasado no influye en la estructuración genética de las poblaciones.

En cuanto a manejo forestal en la región mesoamericana, los árboles del género *Quercus* son usualmente utilizados para la producción de leña, ya que, las personas prefieren su uso por el especial sabor que le otorga a la comida. Gorgonio-Ramírez et al. (2017) compararon la variabilidad genética entre poblaciones de *Q. crassifolia* Bonpl. con diferentes formas de aprovechamiento, poblaciones en las que su madera se utiliza como leña para aprovechamiento local y poblaciones con manejo forestal en Sierra Juárez, Oaxaca. Los resultados mostraron que tanto las poblaciones manejadas y no manejadas de *Q. crassifolia* Bonpl. poseen una alta variabilidad genética y que no existe estructuración poblacional significativa entre estas, sin embargo, se pudo observar pérdida de alelos en dos poblaciones recientemente colonizadas, esta pérdida de alelos se adjudica a efectos de colonización como cuellos de botella o efecto fundador causados por el aprovechamiento de leña. Los autores sugieren que durante el corte y aclareos de encinos se mantengan individuos grandes y medianos que puedan reproducirse y así mantener la salud genética de las poblaciones.

Las técnicas de secuenciación de nueva generación son novedosas, estas se aplican ampliamente en estudios poblacionales en Europa, China y Japón.

Al ser organismos de vida larga, los árboles del género *Quercus* son utilizados como especies modelo para comprender eventos climáticos, ecológicos y evolutivos que ocurrieron en el pasado. Xu y colaboradores (2015) estudiaron poblaciones de *Q. glauca* Thunb., especie que se distribuye ampliamente en los bosques siempre verdes del subtrópico del este de Asia, para comprender el patrón de divergencia e historia demográfica de esta especie en China y Japón, utilizando regiones inter génicas espaciadoras del genoma cloroplástico y modelamiento de nicho ecológico. Encontraron alta diferenciación haplotípica, así como, alta diversidad inter poblacional e intra poblacional. Los autores sugieren que esta diferenciación se debe a la limitada capacidad de dispersión de las semillas de esta especie en tan amplio rango geográfico.

Por su parte Romero Rangel (2006) estudió las especies del complejo *Acutifoliae*, dentro del cual se encuentra *Q. skinneri* Benth, revisando muestras de México, Guatemala, Honduras y El Salvador. Se concluyó que *Q. skinneri* Benth. es una de las especies de robles más polimórficas en la región, variando especialmente el largo de los peciolos y el tamaño de sus bellotas.

Biología del género *Quercus*

El género *Quercus* perteneciente a la familia *Fagaceae*, está compuesto por árboles y arbustos monoicos, con inflorescencias masculinas en amentos e inflorescencias femeninas lignificadas producidas en las axilas de las hojas (Ducousso et al., 1993), caracterizados por la producción de bellotas, su reproducción anemófila, su longevidad, con especímenes de más de 900 años, y su gran tamaño, algunas especies pueden medir hasta más de 40 metros de altura (Rodríguez-Acosta y Coombes 2020). Es considerado un clado monofilético (Manos et al., 1999) distribuido ampliamente por Europa, Asia y América con alrededor de 600 especies representativas alrededor del mundo, de las cuales, podemos encontrar alrededor de 160 especies solamente en México (Rodríguez-Acosta y Coombes, 2020), país considerado como el centro de distribución del género en el nuevo mundo (Nixon, 2006).

Son dominantes en diversos ecosistemas, como son para el continente americano el bosque subtropical siempre verde, la sabana tropical y subtropical, el bosques de pino-roble, el bosque tropical premontano, el bosque tropical montano y diversos tipos de bosques nubosos (Nixon ,2006).

Taxonómicamente los robles se dividen en 2 grupos, separados en tres secciones, los robles blancos pertenecientes a la sección *Quercus* o *Leucobalanus*, los robles rojos pertenecientes a la sección *Lobatae*, y los robles intermedios o dorados pertenecientes a la sección *Protobalanus* (Nixon, 1993). Están distribuidos en toda Centroamérica, sin embargo, el número de especies disminuye a medida nos acercamos a su distribución más austral, en Colombia, el cual, cuenta con la presencia de una especie (Nixon, 2006). En El Salvador se encuentran reportadas 16 especies, ninguna de estas endémicas (Berendsohn et al., 2009).

Ciclo de Vida

A diferencia de los robles neárticos que tienen una estacionalidad marcada, produciendo flores en la primavera y bellotas en el otoño, la producción de flores para los robles neotropicales, especialmente los mesoamericanos, no se encuentra completamente estudiada y puede que varíe según la especie, sin embargo, a modo general se da en la época seca de Octubre a Febrero, mientras que la producción de bellotas se da en la época lluviosa, de junio a septiembre (Nixon, 2006).

La primera producción de bellotas de un árbol puede variar según la especie, su esperanza de vida, la densidad de árboles en su ecosistema, una menor densidad favorece la madurez temprana de los árboles, y el sitio en el que se encuentran. Para los robles de vida larga el inicio de la actividad reproductiva puede variar entre los 30 y 45 años de edad (Ducouso et al., 1993).

Una estrategia reproductiva de los robles es su autoincompatibilidad, es decir, que es muy difícil que un individuo se reproduzca con sí mismo, esto se debe al control gamético del crecimiento del tubo polínico en el estigma, sin embargo, es común que se dé hibridación entre árboles pertenecientes a la misma sección sistemática. (Ducouso et al., 1993)

El género *Quercus* L. es uno de los clados de angiospermas leñosas de mayor importancia en el hemisferio norte, tanto en términos de diversidad de especies y dominancia ecológica como de valor económico. A pesar de que muchas especies de robles son árboles excepcionalmente altos, existe un buen número de especies de arbustos y árboles pequeños, especialmente en hábitats secos y en ambientes con condiciones edáficas adversas (Nixon, 2006).

Desde la perspectiva de la taxonomía y sistemática, varios aspectos del género son de interés, por ejemplo, se considera que los robles poseen una capacidad excepcional para la hibridación entre especies. Esto se basa en la gran variabilidad observada en especies, a veces presente en individuos aislado, pero en otros casos, en poblaciones completas, mostrando variabilidades morfológicas que incluyen características de más de una especie reconocida (Nixon, 2006). A pesar de que las especies de robles de México y Centroamérica no han sido estudiadas a tanta profundidad como las especies europeas y estadounidenses, los robles neotropicales parecen exhibir patrones similares de dispersión y variabilidad morfológica.

Quercus skinneri Benth.

Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Fagales
Familia	Fagaceae
Género	<i>Quercus</i> L.
Sección	Lobatae
Especie	<i>Quercus skinneri</i> Benth.

Descripción botánica.

Árbol de 7 a 40 metros de alto, corteza oscura y agrietada, ramillas de 1 a 4 mm de diámetro, glabras, rojizas oscuras o a veces más claras, lustrosas, con lenticelas claras, por lo general menores de 1 mm, a veces hasta de 1.5 mm de largo; yemas ovoides con el ápice obtuso, de 4-7 mm de largo, con las escamas glabras, a veces con escasos tricomas en sus ápices, de color castaño; estípulas lineares, pubescentes, de 7-15 mm de largo por 1-2 mm de ancho, deciduas antes de la madurez de las hojas Figura 1a (Romero Rangel, 2006).

Hoja.

Posee hojas maduras delgadas, a veces semicoriáceas, elípticas u ovadas, de 6 a 30 cm de largo por 2.5 a 12 cm de ancho, ápice atenuado, acuminado o agudo, aristado; base truncada, cordada u obtusa, a veces en hojas jóvenes se observa decurrente; márgenes engrosados, planos o ligeramente revolutos, con 10 a 13 dientes aristados distribuidos de cada lado en todo el margen de la lámina, aristas de 5 a 10 mm de largo, nervaduras secundarias 9 a 15 en cada lado de la lámina de la hoja, ascendentes, rectas y paralelas, pasando directamente hasta los dientes y terminando en una arista. Haz opaco o algo lustroso, glabro, a veces con pocos tricomas fasciculados estipitados cortos y tricomas glandulares sobre o cerca de la nervadura primaria; envés más pálido que el haz, glabro o con escasos tricomas fasciculados estipitados cortos y tricomas glandulares cerca de la nervadura primaria y/o tricomas fasciculados estipitados largos en las axilas de las nervaduras, epidermis lisa

y papilosa; pecíolos delgados, de 2.5-7 cm de largo por 1.5 mm de ancho, glabros o con algunos tricomas fasciculados estipitados cortos (Figura 1) (Romero Rangel, 2006).

Flor.

Flores masculinas presentes en amentos de 7 cm de largo, con pocas flores o a veces hasta más de 40, perianto sésil, muy pubescente, de 2-3 mm de diámetro, anteras 4-6, glabras, elipsoidales, filamentos de 1-2 mm de largo. Flores femeninas presentes en amentos de 5 mm de largo, con una o dos flores (Romero Rangel, 2006).

Fruto.

Solitario o en pares, de maduración bianual, pedúnculo de 5 a 15 mm de longitud; cúpula hemisférica, de 20 a 45 mm de ancho, de 8 a 20 mm de alto, escamas de color castaño, pubescentes, ápices obtusos, adpresos; bellotas ovoides, de 15 a 50 mm de largo por 20 a 50 mm de diámetro, de color castaño, incluidas un cuarto o menos de su largo en las cúpulas (Figura 1b) (Romero Rangel, 2006).

Q. skinneri es una de las especies más polimórficas de América Central, las características que pueden llevar a conclusiones erróneas son la longitud del pecíolo y la forma y el tamaño del fruto (Muller, 1942).



Figura 1: Especímenes herborizados de *Quercus skinneri* Benth. a) Espécimen del Volcán de San Vicente, alojada en el herbario US, se observan hojas y yemas. b) Espécimen del municipio de Izcalco, alojada en el herbario MHES, se observan hojas y frutos.

Distribución.

Se distribuye desde el centro de México, pasando por Guatemala, Honduras y El Salvador. Habita en bosques de encino, bosque tropical caducifolio y perennifolio, bosque mesófilo de montaña, y bosque de pino encino, entre los 700 y 2200 m.s.n.m. (Muller, 1942; Romero Rangel, 2006). Para El Salvador, se reporta en los departamentos de Ahuachapán, Sonsonate, Cuscatlán, San Vicente y Morazán (Berendsohn et al., 2012) (Figura 2).

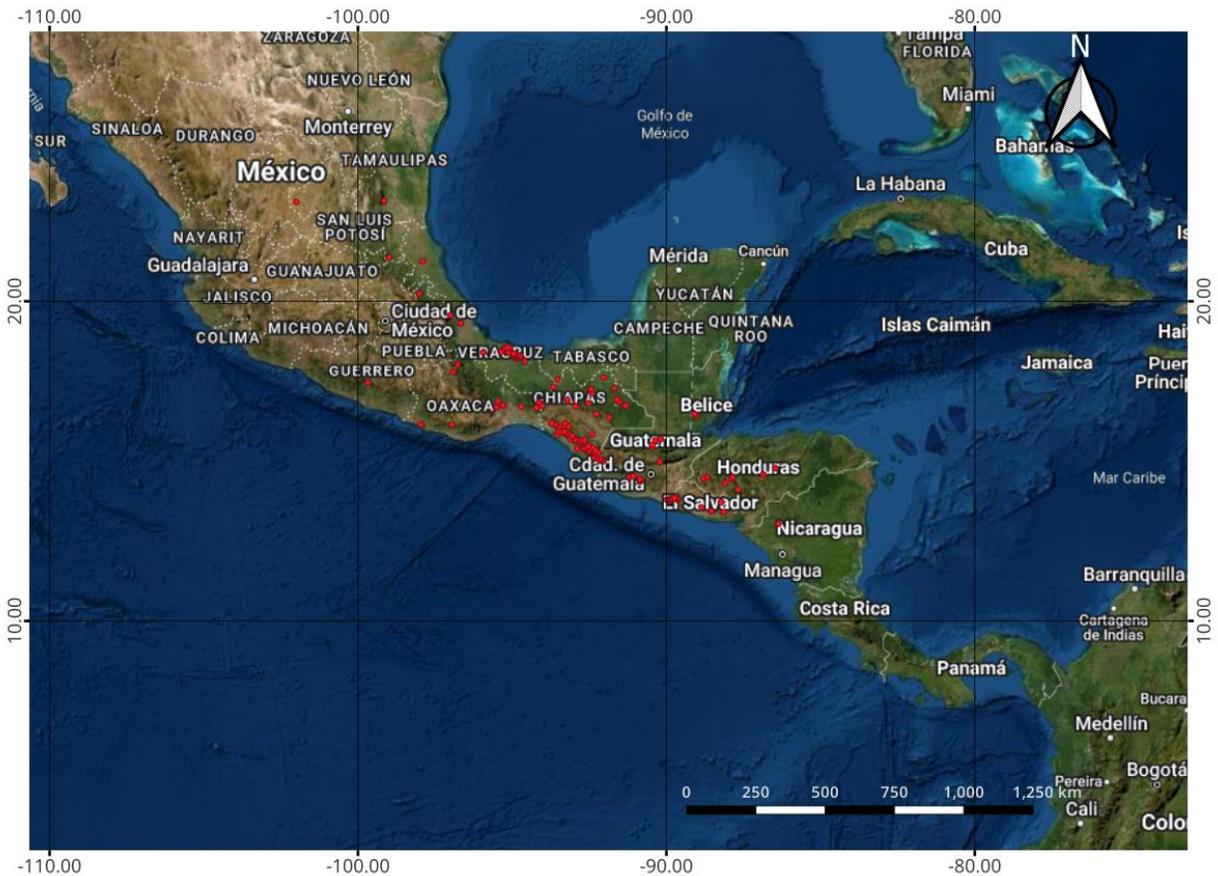


Figura 2. Mapa de distribución de *Quercus skinneri* Benth. Fuente: Elaboración propia con base de datos del portal GBIF. GBIF.org (22 August 2022) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.8yenpj>

Genética de poblaciones

La genética de poblaciones estudia la variación genética en las poblaciones y como esta cambia en el tiempo, está basada en las leyes mendelianas de la herencia, estudiando patrones de variación o estructura genética entre y dentro de grupos de individuos que se reproducen entre sí. (Hartl y Clark, 1997; Klug, William S., Cummings, Michael R., Spencer, 2006)

El estudio de la genética de poblaciones es de especial interés ya que, a medida se dan los cambios en la estructura genética de las poblaciones se impulsan cambios evolutivos en estas (Hartl y Clark, 1997). Estos cambios se deben a diferentes razones como, la deriva genética, el flujo genético, y la endogamia impulsados por la fragmentación de hábitats, aislamiento y la reducción en el tamaño de las poblaciones. (Ellstrand y Elam, 1993)

Variabilidad genética

La variabilidad genética se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. (Piñero et al., 2008a)

Esta variabilidad se deriva de mutaciones, que son la incorporación permanente de errores al azar en el ADN que resultan en diferencias en las secuencias ancestrales y descendientes de este y las diferencias en las frecuencias de haplotipos que cambian ya sea por migración, selección y por el azar. (Hamilton, 2009; Frankham et al., 2012)

Variabilidad genética neutral y adaptativa

La variabilidad genética neutral se refiere a los cambios mutacionales en el genoma, los cuales, no tienen efecto alguno en la eficacia biológica de una especie, estos ocurren al azar y no por selección natural. La variabilidad genética neutral nos ayuda a dilucidar la conectividad del paisaje mediante la medición del flujo genético, migración o dispersión. (Holderegger et al., 2006)

La variabilidad genética impulsada por la selección natural y que por lo tanto influye directamente en la eficacia biológica de una especie se conoce como variabilidad genética adaptativa, al estudiar genes adaptativos podemos evaluar cómo las poblaciones responden a los cambios climáticos ya sea provocados por el hombre o por eventos naturales, su capacidad de resiliencia a plagas, pestes,

enfermedades, a la competencia de especies invasoras, entender la forma, la velocidad y las causas de la pérdida de diversidad genética, entre otras. (Piñero et al., 2008a)

Deriva Genética

Se define como cambios al azar en las frecuencias haplotípicas causado por un tamaño poblacional pequeño. La acción de la deriva genética en las poblaciones cobra importancia cuando los efectos de la selección y flujo genético son pequeños y relativos al tamaño poblacional, esta puede causar fluctuaciones sin ningún patrón predecible en las frecuencias haplotípicas las cuales pueden resultar en fijación al azar o pérdida de haplotipos. El efecto de la deriva genética puede ser remontado por medio del estudio de la ancestría de poblaciones actuales, esto por medio de la aplicación de modelos coalescentes. (Hamilton, 2009)

Teoría de coalescencia

Es una colección de modelos matemáticos que tienen la finalidad de mostrar tiempos pasados en las poblaciones, utilizando la divergencia genética presente en estas (Wakeley, 2008) y calculando la probabilidad de posibles patrones genealógicos desde el presente hasta tiempos pasados llegando a poder estimar el tiempo en que estas tuvieron un ancestro común más reciente (ACMR). Cuando dos linajes se remontan en el tiempo a un solo linaje ancestral, se dice que es un evento coalescente (Hamilton, 2009).

Estructura Poblacional

Una población puede definirse como un grupo de individuos de la misma especie que habitan una región geográfica suficientemente cercana una de otra para que estos individuos se reproduzcan entre sí. Cuando esta proximidad geográfica es alterada ya sea por causas antropogénicas o naturales y el hábitat se fragmenta, alterando la conectividad y el flujo de genes entre individuos, entonces, es posible que se forme una estructura poblacional (Frankham et al., 2012), definida como, el patrón o la distribución de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones (Milgroom, 2015).

Código de barras de ADN.

El término “DNA barcoding”, (código de barras de ADN, en español) fue acuñado por Hebert et al. (2003) para describir el uso de secuencias de ADN del gen citocromo C oxidasa (*COI*), como identificadores similares a un código de barras para identificar especies biológicas, con la idea de asegurar un sistema de identificación confiable, barato y de fácil uso, así como una herramienta para visualizar patrones de diversificación y evolución de la vida.

A pesar de su gran efectividad en otros grupos, el gen *COI* posee una limitada utilidad en la identificación de especies vegetales, ya que este presenta una baja variación entre distintos grupos de plantas (Chen et al. 2010). Como alternativa, el Consorcio para el código de barras de la vida (CBOL por sus siglas en inglés), propuso el uso en conjunto de los genes *rbcL* y *matK*, los cuales codifican la subunidad grande de la enzima RuBisCo y de la Maturasa K, respectivamente, que si bien, son capaces de discriminar satisfactoriamente entre familias de plantas, poseen un 72% de éxito en la discriminación a nivel de especie (Janzen 2009; Li et al. 2015).

Con el fin de identificar si existe una mejor opción para utilizar como código de barras, Chen et al. (2010) comparó la eficacia de los genes *psbA-trnH*, *matK*, *rbcL*, *rpoC1*, *ycf5*, *ITS* e *ITS2* como código de barras en 5905 especies, divididas en 1010 géneros, 219 familias y 7 filos. Este concluyó que el gen *ITS2* puede ser usado como marcador universal para plantas, ya que presentó la mayor distancia intra e interespecífica, mayor porcentaje de éxito en la identificación de especies y el mayor porcentaje de amplificación a nivel general. En años posteriores el gen *ITS2* ha sido utilizado con éxito en la identificación de especies medicinales de la familia Fabaceae y Selaginellaceae (Gao et al. 2010; Gu et al. 2013), así como en especies de problemática clasificación en las familias Orchidaceae y Solanaceae (Feng et al. 2015; Feng et al. 2016).

METODOLOGÍA

Descripción del sitio de estudio

Para la presente investigación se definieron cuatro poblaciones separadas entre sí, basándose en reportes históricos de la especie, la ubicación de cada sitio de muestreo se muestra en la figura 3.

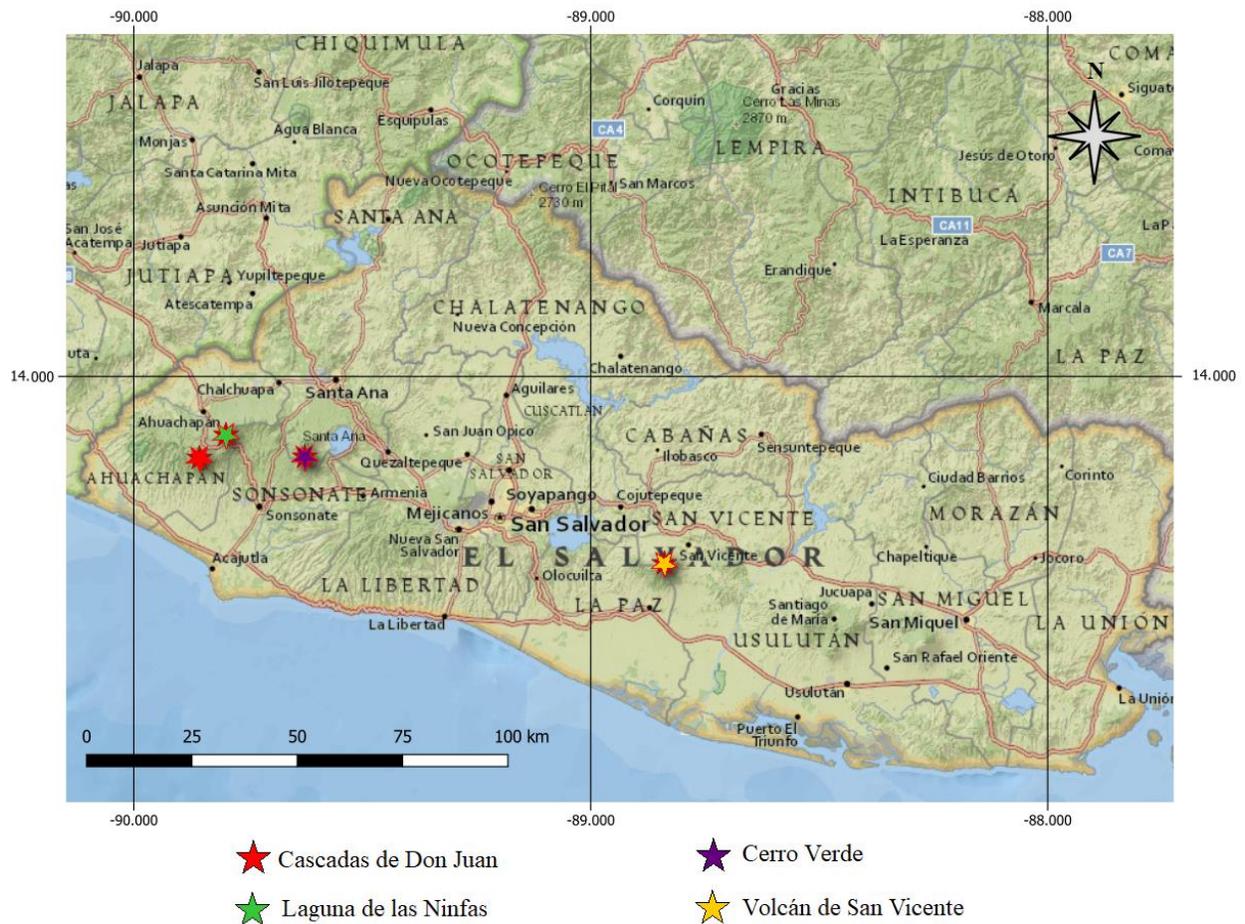


Figura 3: Ubicación geográfica de la distribución de los sitios de muestreo.

Parque Ecoturístico Las Cascadas de Don Juan, Ahuachapán.

Ubicado en el municipio de Concepción de Ataco, en el departamento de Ahuachapán. Parte de la finca “La Esperanza” posee un área de tres manzanas, con una altitud media de 900 m.s.n.m.

Laguna de las Ninfas, Ahuachapán.

Perteneciente al Área de Conservación y Reserva de Biósfera Apaneca-Ilamatepéc, ubicada al norte de la ciudad de Apaneca, departamento de Ahuachapán. Con una altitud máxima de 1605 m.s.n.m. se caracteriza por la presencia de ecosistemas de bosque nebuloso, cafetal y vegetación acuática (Fundación Socioeconómica y Restauración Ambiental y Fondo de Inversión Natural de El Salvador, 2016)

Parque Nacional Cerro Verde, Santa Ana.

Pertenece al Área de conservación y reserva de Biosfera Apaneca-Ilamatepec se ubica entre los municipios de Santa Ana y Chalchuapa, del departamento de Santa Ana, y Nahuizalco e Izalco, del departamento de Sonsonate. Tiene una extensión de 2,734.6 hectáreas en un gradiente de altitud entre 600- 2362 m.s.n.m. con presencia de cafetales y vegetación de bosques nebulosos (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2004)

Volcán de San Vicente, Finca Santa Margarita.

El volcán Chichontepec forma parte del arco volcánico de El Salvador, ubicado entre los departamentos de La Paz y San Vicente, se encuentra a 50 km al este de San Salvador. Posee una altitud máxima de 2180 m.s.n.m., sus laderas están cubiertas en su mayoría por plantaciones de café, encontrándose remantes boscosos en las zonas con mayor pendiente y cerca de su cima (Major, et al. 2001).

Metodología de campo.

Recolecta de muestras.

Los sitios de colecta se determinaron mediante reportes de muestras de herbario de los individuos pertenecientes a la especie, así también, se utilizaron datos de su distribución altitudinal para la elección de los sitios. La selección de los individuos se realizó mediante muestreo dirigido, eligiendo árboles con un diámetro a la altura del pecho mayor a 10 cm, con altura aproximada mayor a 6 m y una distancia mínima de 10 m entre árbol. Se colectaron los primeros 12 árboles encontrados que cumplieran con esta característica en las poblaciones de La Laguna de Las Ninfas, Cerro Verde y Volcán de San Vicente; para la población de las Cascadas de Don Juan, debido a la inaccesibilidad en la zona de muestreo, solo fue posible la colecta de 4 individuos.

Se recolectaron hojas maduras, tomando cinco hojas de cada árbol, estas se limpiaron con etanol 70° para eliminar contaminantes ambientales, se colocaron en bolsas de papel y se introdujeron en un desecador para deshidratar el material, con la finalidad de preservar las muestras para su posterior uso (Fernández et al., 2000). Se repitió este proceso para cada árbol muestreado, anotando la altitud y coordenadas geográficas de cada espécimen. Además, se recolectó una rama por cada espécimen para servir como material de referencia, este material se encuentra resguardado en el Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador. Estos pasos se muestran en la figura 4.



Figura 4: a) Colecta de muestras en campo, b) Prensado de las muestras vegetales, c) Muestra herborizada.

Metodología de laboratorio.

Ubicación del laboratorio.

El análisis molecular del material vegetal se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular de la Escuela de Biología en la Universidad de El Salvador.

Extracción del ADN.

Para la extracción del material genético se utilizó una modificación del protocolo no comercial propuesto por Fernández et al. (2000), en el cuál, utilizando un mortero y pistilo, se pulveriza la hoja previamente desecada, agregando nitrógeno líquido para lograr un mayor grado de ruptura de las paredes celulares. Se agrega al material pulverizado el buffer de extracción CTAB (figura 5-a), la cual contiene Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), cloruro de sodio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tris(hidroximetil)aminometano (Tris), 2-mercaptoetanol (BME) y polivinilpirrolidona (PVP), esta solución ocasiona la lisis de las diferentes estructuras celulares, liberando el material genético, además proporciona un medio que garantiza la preservación de la integridad del ADN. Posteriormente, utilizando isopropanol y etanol, se aisló y purificó el ADN (figura 5-b), el cual fue resuspendido en agua ultra pura. Se crearon dos alícuotas por cada muestra, utilizando una para los análisis moleculares y dejando una de reserva. El protocolo completo se encuentra en el anexo 1.

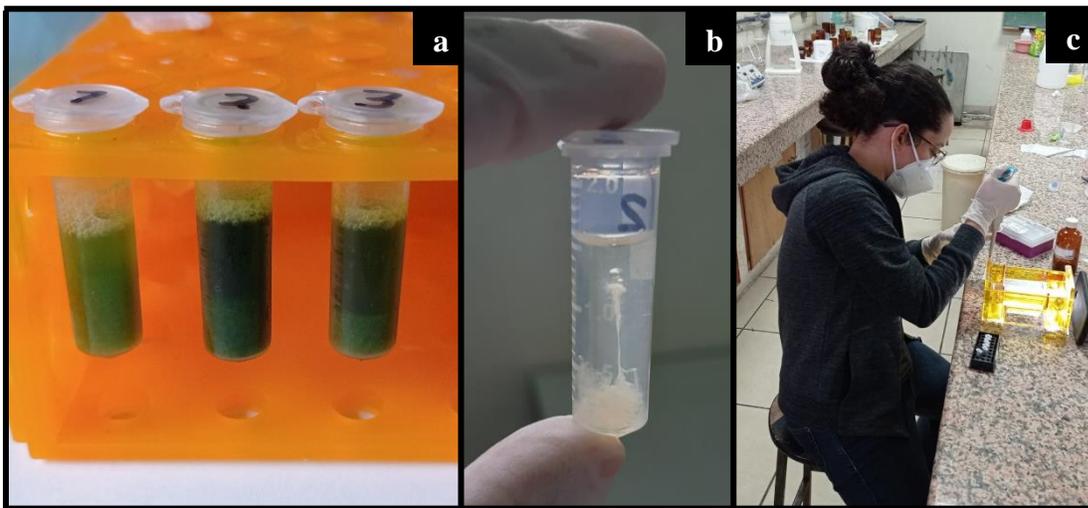


Figura 5: a) Digestión del material vegetal pulverizado, b) Precipitación del ADN, c) Realización de electroforesis del ADN extraído.

Determinación de la integridad del ADN.

Se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1.5% (figura 5-c), en las cuales se comparó el tamaño de las bandas de ADN, así como la presencia de barridos, sub-bandas o restos de ADN degradado, las imágenes de estos geles se muestran en el anexo 2. Este proceso se repitió con los productos de PCR, para confirmar la amplificación de una sola banda del tamaño correcto.

Amplificación de la región ITS2 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizaron los cebadores F=ATGCGATACTTGGTGTGAAT; R=TCCTCCGCTTATTGATATGC para la región ITS2 en plantas (Fazekas et al. 2012). Para la preparación de cada una de las 38 muestra, se utilizó la premezcla Promega GoTaq® Master Mix, la cual contiene los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción (dNTPs, cloruro de magnesio, Taq polimerasa y buffer de reacción), a esta se le adicionaron los cebadores, el ADN y agua ultrapura. Las concentraciones y cantidades de cada componente se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Concentración y cantidades de los componentes necesarios por reacción de 25µL

Componente	Concentración stock	Concentración final	Vol. por Rx
Promega GoTaq® Master Mix	2X	1X	12.5 µL
Cebador Forward	10µM	0.2µM	0.5 µL
Cebador Reverse	10µM	0.2µM	0.5 µL
ADN	25X	3X	3 µL
Agua ultrapura	-	-	8.5 µL

La PCR se realizó en un termociclador MultiGene Mini TC020-24, el tiempo de desnaturalización inicial, así como de los ciclos de desnaturalización y elongación se programaron según la hoja de datos de la Master Mix Promega GoTaq®. La temperatura de alineamiento óptima fue determinada de forma experimental, basándose en las temperaturas sugeridas por el fabricante de los cebadores, para asegurar la no amplificación de regiones no específicas del material genético. Se utilizaron controles negativos, en los cuales se sustituyó el ADN por agua ultra pura, con el objetivo de asegurar la ausencia de contaminación por ADN ajeno a las muestras. La tabla 2 muestra detalles de la programación del termociclador.

Tabla 2: Detalles de la programación del termociclador para la PCR del gen ITS2.

Fase	N de ciclos	Temperatura	Duración
Desnaturalización/activación	1	95°C	10 minutos
Desnaturalización	35c	95°C	1 minuto
Alineamiento	35c	59°C	30 segundos
Elongación	35c	74°C	45 segundos
Elongación final	1	74°C	7 minutos
Espera	1	4°C	Indefinida

Secuenciación de los productos de PCR.

Se transfirieron 20 μ L de los productos de PCR a una placa de 96 pozos, asignando un pozo por muestra, la placa fue sellada usando una tira de 8 tapas en cada columna. La placa fue enviada a la empresa coreana MacroGen Inc., en la cual se realizó la purificación de los productos de PCR, posteriormente se utilizó el método secuenciación por electroforesis capilar en el equipo analizador ABI 3730XL (Applied Biosystems®). Los archivos resultantes con la información de las secuencias correspondientes a un solo sentido de la cadena de ADN fueron descargados del portal web de la empresa.

Procesamiento de las secuencias.

Los electroferogramas resultantes de la secuenciación fueron analizados con el software SnapGene® 5.3.1. (Figura 6), en este se recortaron las bases en los extremos de las secuencias con una puntuación de calidad menor a 40 en el gráfico *Phred*, ya que a partir de esta puntuación se tiene una certeza del 99.99% en la identificación de cada nucleótido (Ewing y Green 1998). Posteriormente, se revisó la definición de cada pico de fluorescencia, cerciorándose de que estos no estén entrelazados o presenten picos de menor tamaño, ya que ambos fenómenos representan incertidumbre en la lectura de la secuencia (Márquez et al. 2014). Por cada electroferograma procesado se exportó un archivo FASTA con las secuencias finales.

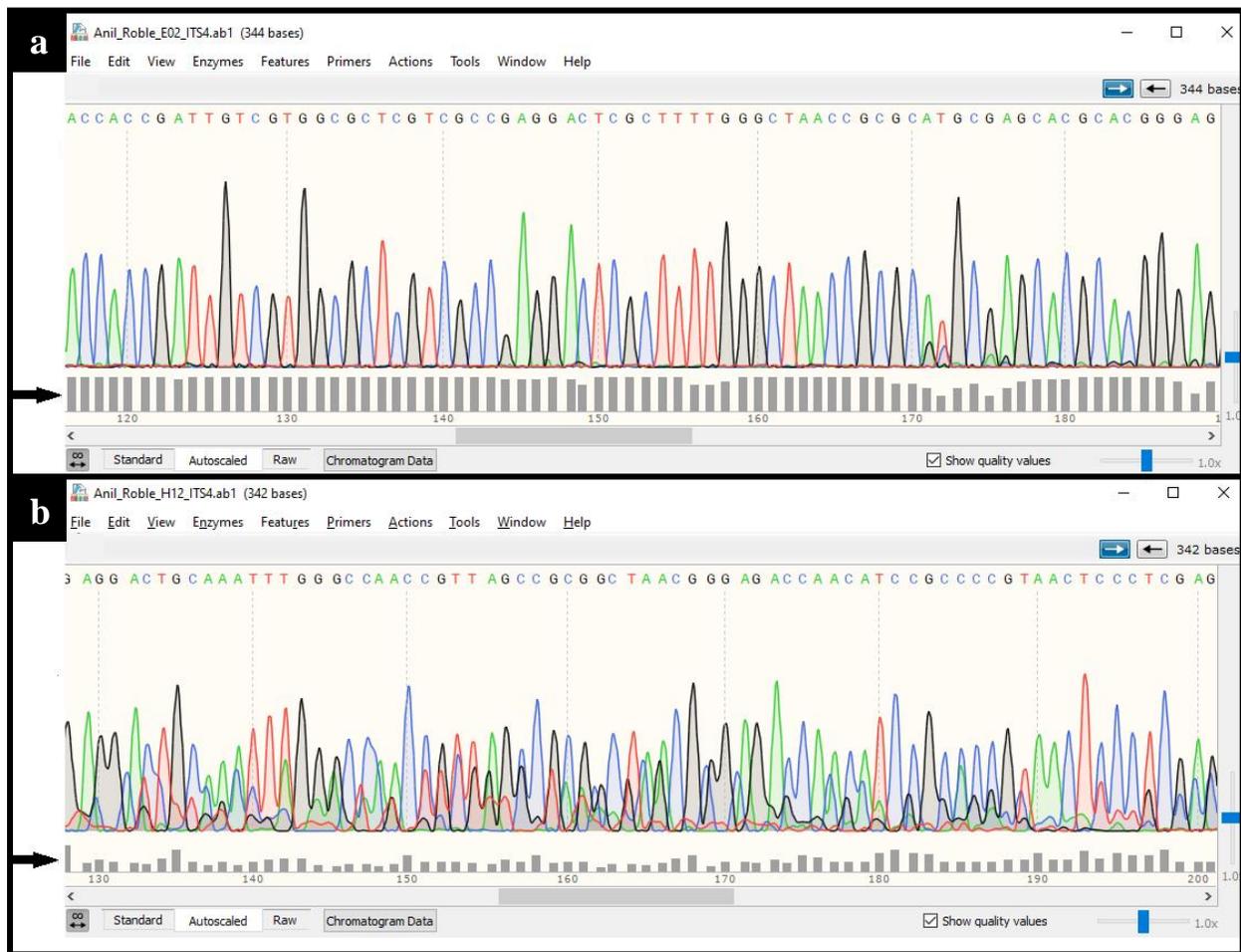


Figura 6: Visualización de los electroferogramas resultantes de la secuenciación por electroforesis capilar en el software SnapGene®. a) Lectura de buena calidad, con valores >40 y picos bien definidos, b) Lectura de mala calidad con valores <40 y presencia de ruido por picos de menor tamaño. Las flechas negras señalan los gráficos de calidad *Phred*.

Alineamiento de las secuencias

Una vez obtenidas las secuencias consenso, se procedió a realizar un alineamiento múltiple de secuencias (MSA por sus siglas en inglés) con el fin de poder analizar las secuencias en conjunto, este proceso se realizó mediante la implementación del algoritmo MUSCLE, incluido en el software MEGA-X 10.2.2. Posterior al alineamiento, se eliminaron los huecos generados por un solo par de bases y se recortaron los extremos de todas las secuencias, para hacer coincidir su tamaño.

Análisis estadístico.

Análisis de diversidad genética.

Se utilizó el software DnaSP v6.12.03. (Rozas y Rozas, 2018) para calcular los diferentes índices utilizados en la medición de la variación genética, mediante el análisis de secuencias, siendo estos:

Diversidad nucleotídica

Nei & Li (1979) definen la diversidad nucleotídica en un grupo de secuencias como el número promedio de sitios nucleotídicos diferentes entre dos secuencias elegidas al azar. Se calcula mediante fórmula:

$$\pi = n / (n - 1) \sum_{ij} X_i X_j P_{ij}$$

n=número de secuencias

π = Diversidad nucleotídica

X_i = Frecuencia de la secuencia i_{th}

X_j = Frecuencia de la secuencia j_{th}

P_{ij} = Diferencias nucleotídicas en cada sitio entre las secuencias i_{th} y j_{th}

El valor de π suele encontrarse entre 0.005 – 0.020, este puede variar dependiendo de factores como el locus o la especie estudiada (Frankham et al., 2010).

Diversidad y frecuencia haplotípica

Los haplotipos son conjuntos de variaciones genéticas que se encuentran en una región definida del mismo cromosoma y que se heredan juntas en una población. A partir de los haplotipos encontrados, se generó una matriz de frecuencias haplotípicas, en la cual, se agrupó cada haplotipo según su presencia y frecuencia en cada población, asimismo, se calculó la diversidad haplotípica (también conocida como diversidad de genes) y que se define como, la probabilidad de que dos haplotipos muestreados al azar sean diferentes (Nei, 1987; citado en Goodall-Copestake et al., 2012). Se calculó mediante la fórmula:

$$h = \frac{n}{n-1} p_i$$

h= Diversidad haplotípica

n= número de individuos en la muestra

p_i = La frecuencia del haplotipo i_{th} en la muestra

Este índice toma valores entre 0 y 1, cuando este valor se aproxima a 1, se dice que las poblaciones tienen alta diversidad genética. Su interpretación está relacionada al sistema de apareamiento, historia de vida e historia demográfica de cada población (Frankham et al., 2010).

Estructura genética.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Esta prueba determina la existencia de una estructuración poblacional (cuando el porcentaje de variación entre las poblaciones es mayor al porcentaje de variación dentro de las poblaciones) utilizando los estadísticos *phi* (Φ), análogos a los estadísticos *F* de Wright, los cuales son calculados utilizando las frecuencias haplotípicas y el número de mutaciones entre haplotipos. Estos nos muestran el grado de diferenciación entre las divisiones de las poblaciones asociadas con diferentes niveles jerárquicos definidos a priori: dentro de las poblaciones (Φ_{ST}), entre poblaciones dentro de los grupos (Φ_{SC}) y entre los grupos (Φ_{CT}) a través de un procedimiento de permutaciones no paramétricas (Excoffier et al., 1992). Se utilizó el software Arlequin v3.5.2.2 para la realización de esta prueba (Excoffier et al., 2017).

Comparación por pares de los índices de distancias genéticas.

El índice F_{ST} puede ser entendido como la pérdida de heterocigosidad en un locus a causa de la existencia de una estructuración genética (Nei y Genetics, 1973), relacionándose de la siguiente forma

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

H_T =promedio de la heterocigosis esperada en la población total.

H_S =promedio de la heterocigosis esperada dentro de la subpoblación.

El valor de este índice es proporcional al grado de diferenciación entre las poblaciones, tomando el valor de 0 al no existir diferencia entre las poblaciones ($H_T=H_S$) y de 1 cuando cada población es totalmente diferente ($H_S = 0$) (Piñero et al. 2008b). Si bien la ecuación anterior facilita la comprensión del índice, se suele utilizar la ecuación propuesta por Weir & Cockerham (1984) para su cálculo, la cual estipula

$$F_{ST} = \frac{\sigma_p^2}{p(1-p)}$$

σ_p^2 = varianza en la frecuencia alélica entre las poblaciones

$p(1-p)$ = varianza en el estado alélico para un alelo escogido al azar de la población total.

De este modo, puede ser interpretado como la proporción de diversidad genética en la población entera.

Por su parte Slatkin (1995) propuso el uso del F_{ST} coalescente, el cual es un descriptor la reducción relativa en el tiempo de divergencia en un par de alelos o secuencias tomadas de una misma subpoblación versus las tomadas de la población total, este equivale a

$$F_{ST, coal} = \frac{t - t_0}{t} = \frac{F_{ST}}{(1 - F_{ST})}$$

Donde t = tiempo medio de divergencia al ancestro común de un par de alelos de la meta población total, t_0 = tiempo medio de divergencia al ancestro común de un par de alelos de la misma subpoblación.

Esta medida es especialmente útil ya que provee un índice con una probabilidad alta de describir el patrón de la diferenciación genética de sitios polimórficos neutrales con bajos índices de mutación (Whitlock, 2011).

El número promedio de diferencias entre poblaciones de Nei sin procesar (D) y neto (D_A) permiten el cálculo de distancias genéticas utilizando únicamente los datos de las secuencias nucleotídicas, se calculan mediante las fórmulas:

$$D = \pi_{12} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{k_i} x_{i1} x_j p_{ij}$$

k = número de haplotipos población 1.

k_1 = número de haplotipos población 2.

x_{j1} = Frecuencia del haplotipo i_{th} en la población 1

p_{ij} = Diferencias entre los haplotipos i_{th} y j_{th}

$$D_A = \pi_{12} = \frac{\pi_1 + \pi_2}{2}$$

π_1 = Diversidad nucleotídica población 1.

π_2 = Diversidad nucleotídica población 2.

Ambos índices se fueron calculados con el software Arlequin v3.5.2.2, siendo presentados en formato de matriz, comparando cada sitio de muestreo.

Flujo genético

Definido como el intercambio de genes efectivo entre poblaciones (Hedrick, 2011). Se calculó utilizando el programa Arlequin v3.5.2.2, a partir del valor de F_{ST} definidos por Weir and Cockerham (1984), tomando las suposiciones del modelo de islas, donde un número finito de islas o subpoblaciones de tamaño N intercambian una fracción m de migrantes cada generación entre cualquiera de las subpoblaciones y que el ratio de mutación u es insignificante al compararse con m (Wright, 1949). El flujo genético se representa como M , definido como el número absoluto de migrantes que comparten las poblaciones, se calcula mediante la fórmula:

$$M = \frac{1 - F_{ST}}{2 F_{ST}}$$

Teóricamente se dice que para que una población no llegue a fijación debe llegar 1 migrante por generación, ósea que, cuando $M \Rightarrow 1$ se cumple con el parámetro de intercambio de genes para

que la población no llegue a fijación y no actué la deriva genética, mientras que, cuando $M < 1$ la población puede llegar a fijarse y diferenciarse por la acción de la deriva genética (Mitton, 2013).

Aislamiento por distancia

Se realizó la prueba de Mantel utilizando el programa Arlequin v3.5.2.2., esta permite comprobar el supuesto de aislamiento por distancia descrito por Wright (1943), donde las poblaciones con un rango de dispersión pequeño son más similares genéticamente que aquellas poblaciones que se encuentran más alejadas, por lo que se espera una correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica (Meirmans, 2012). Se utilizaron dos matrices de distancia, siendo estas los valores F_{ST} y el índice D de Nei, ambos calculados con anterioridad. Se utilizó el software Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3. (Ersts), en el cual se introdujeron coordenadas de los distintos puntos de muestreo y con ellas el programa produjo una matriz de distancias geográficas.

Mapa de haplotipos

Es una representación gráfica de las diferencias existentes en los haplotipos, a través del agrupamiento de las secuencias de ADN en un mismo vértice, el tamaño del vértice es proporcional al número de secuencias que se encuentran en su interior. Los haplotipos divergentes están conectados entre sí mediante bordes que muestran las diferencias mutacionales que los separan de otros vértices (Phillips et al., 2019).

El mapa de haplotipos se generó en el programa de PopART, utilizando el método Median Joining Network (Bandelt et al., 1999). Este método cumple con la probabilidad de parsimonia, así como su precisión y compatibilidad al realizar las uniones entre nodos o vértices, también, es recomendable su uso cuando hay una distancia relativa entre los haplotipos en donde puede haber haplotipos perdidos. (Cassens et al., 2005)

Mapa filogenético

La finalidad de un mapa filogenético es mostrar la historia evolutiva del taxón en estudio (Peña, 2014), en este caso se utilizó el programa PhyML (Lemoine et al., 2019) disponible en (<http://www.phylogeny.fr/index.cgi>), el método matemático utilizado para generar el árbol filogenético fue descrito anteriormente.

RESULTADOS

Extracción y amplificación del ADN de las muestras.

Durante la fase de campo se recolectó un total de 40 muestras, se logró la extracción de ADN genómico de calidad y la amplificación del gen ITS2 en el 100% de estas. El fragmento ITS2 presentó un tamaño de ~350 pb de bases.

Procesamiento y alineamiento de las secuencias.

Las secuencias crudas presentaron un tamaño promedio de 346 pb, se eliminaron tres muestras, una del sitio de muestreo Laguna de las Ninfas y dos del sitio de muestro Volcán de San Vicente, ya que no cumplieron el estándar de calidad. Se recortó un promedio de 18 pb en cada extremo de las secuencias, ya que estos presentaron una baja calidad de lectura. Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias y se obtuvo un tamaño final de 308 pb para las secuencias a analizar.

Índices de la diversidad genética.

Los valores de diversidad nucleotídica oscilan entre 0.0057 y 0.0124, correspondiendo a los sitios de muestreo Cerro Verde y Volcán de San Vicente respectivamente. La diversidad haplotípica fue alta para todas las poblaciones, llegando al máximo posible en el sitio Cascadas de don Juan, donde cada muestra presenta un haplotipo diferente para cada individuo de la muestra, los resultados completos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3: Distribución de las secuencias según sitio de muestreo e índices de diversidad genética.

Sitio de muestreo	n	S	π	h	Hd
Cascadas de Don Juan	4	4	0.00649	4	1.000
Laguna de las Ninfas	11	7	0.00685	7	0.872
Cerro Verde	12	5	0.00576	7	0.909
Volcán de San Vicente	10	10	0.01241	5	0.866
Total	37	17	0.01494	14	0.920

n=número de secuencias, S= sitios segregantes, π =diversidad nucleotídica, h=número de haplotipos, Hd=diversidad haplotípica.

Estructura genética.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular indica la existencia de estructuración genética, ya que, el porcentaje de variación entre las poblaciones (56.77%) es mayor que el porcentaje de variación dentro de las poblaciones (43.23%). La tabla 4 muestra la suma de cuadrados, los componentes de variación y el p valor.

Tabla 4: Comparación del porcentaje de variación entre poblaciones y adentro de las poblaciones, con sus grados de significancia.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Componentes de variación	Porcentaje de variación	P-valor
Entre poblaciones	84.631	1.51969	56.77470	0.001
Dentro de las poblaciones	80.991	1.15701	43.22530	0.001
Total	165.622	2.67670		

Comparación por pares de los índices de distancias genéticas.

Al comparar los valores F_{ST} entre sitios de muestreo, se observa un valor F_{ST} bajo entre las Cascadas de Don Juan, la Laguna de las Ninfas y el Cerro Verde, indicando que, entre estas poblaciones, la diferenciación genética es baja y que ninguna de estas presenta fijación. En cambio, las comparaciones de los valores F_{ST} de la población de San Vicente con el resto de poblaciones muestran valores F_{ST} altos, mostrando una diferenciación clara de las poblaciones de occidente con la población de San Vicente. El grado de diferenciación y su significancia estadística se presentan en la figura 7(a). De manera similar, los valores de $F_{ST,coal}$ muestran una tendencia similar, denotando un tiempo relativo de coalescencia mayor en las comparaciones de la población del Volcán de San Vicente con las poblaciones de occidente, estas últimas muestran un tiempo relativo de coalescencia nulo, comportándose como una sola población, la matriz gráfica se presenta en la figura 7(b).

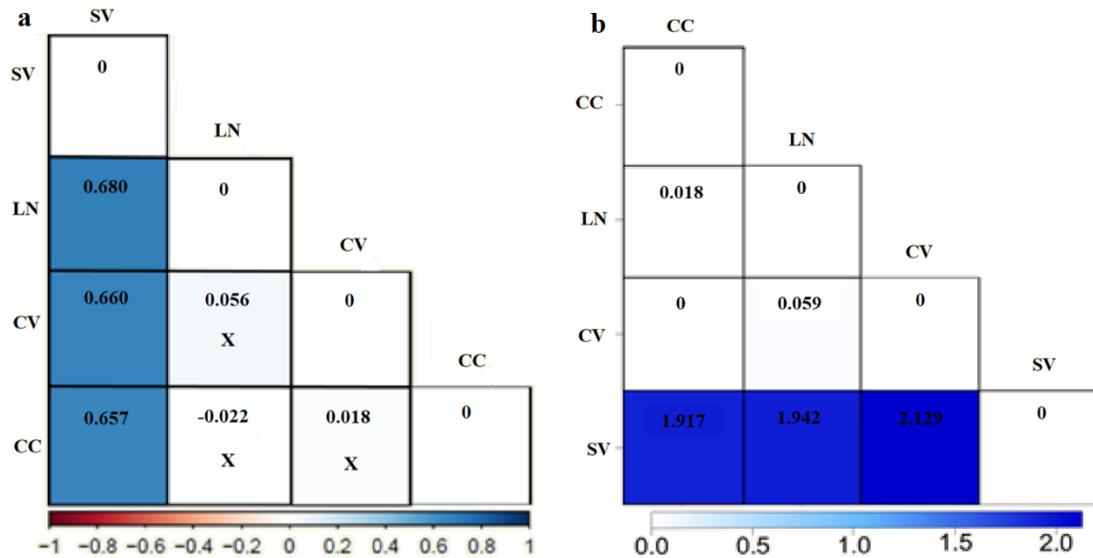


Figura 7: a) Representación gráfica del F_{ST} por pares de poblaciones, b) Representación gráfica de F_{ST} coalescente por pares de población. CC= Cascadas de Don Juan, LN= Laguna de las Ninfas, CV= Cerro Verde. SV= San Vicente. **a) y b)** El color azul del grafico representa un valor alto de F_{ST} y $F_{ST,coal}$, respectivamente. **a)** Las X en los cuadros indican que el p-valor fue no significativo para esa población.

La figura 8 muestra una matriz compuesta, calculada con el número promedio de diferencias entre poblaciones de Nei. En la diagonal central se muestra la variabilidad dentro de las poblaciones, siendo las poblaciones del Volcán de San Vicente y de la Laguna de las Ninfas las que poseen mayor diversidad, el triángulo superior muestra la variabilidad entre las poblaciones. La población del Volcán de San Vicente aporta nuevamente el mayor porcentaje de variabilidad, seguida por la Laguna de las Ninfas. En el triángulo inferior se muestran las distancias de Nei (D), confirmando una vez más el mismo patrón visto con anterioridad, la población del volcán de San Vicente está más distanciada del resto de poblaciones, y las poblaciones de occidente presentan un distanciamiento despreciable.

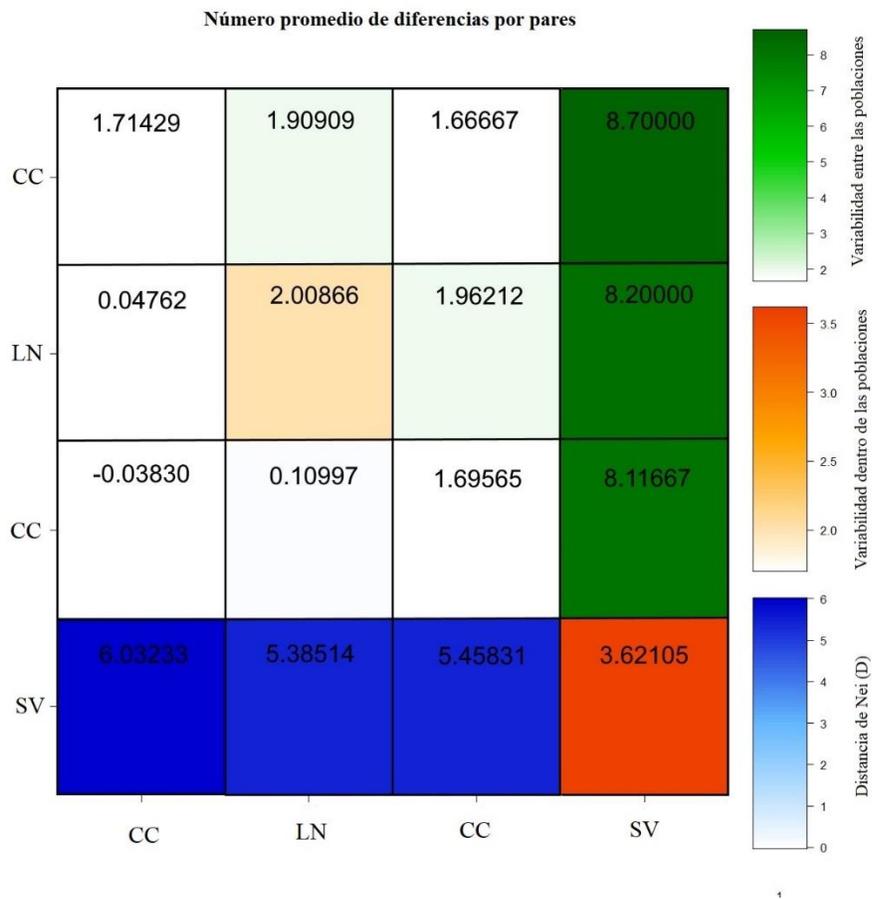


Figura 8: Representación gráfica de las distancias de Nei netas entre poblaciones (en verde), dentro de las poblaciones (en rojo) y la Distancia de Nei (en azul). CC= Cascadas de Don Juan, LN= Laguna de las Ninfas, CV= Cerro Verde. SV= San Vicente.

Flujo genético.

Las poblaciones del occidente del país muestran un mayor número de migrantes entre ellas que con la población del volcán de San Vicente, como puede observarse en la tabla 5. Debido a la baja diferenciación genética entre la población de las Cascadas de Don Juan y el Cerro Verde, las cuales presentaron un valor F_{ST} negativo, no fue posible calcular un número exacto de migrantes.

Tabla 5: Valores F_{ST} y número de migrantes (M) entre poblaciones.

Poblaciones		F_{ST}	M
Cascadas de don Juan	Laguna de las Ninfas	0.02	27.26
Cascadas de don Juan	Cerro Verde	-0.02	Indefinido
Cascadas de don Juan	Volcán San Vicente	0.66	0.26
Laguna de las Ninfas	Cerro Verde	0.06	8.34
Laguna de las Ninfas	Volcán San Vicente	0.66	0.26
Cerro Verde	Volcán San Vicente	0.68	0.23

Aislamiento por distancia

Los gráficos resultantes muestran una fuerte correlación entre las matrices de distancias genéticas (valores F_{ST} y promedio diferencias π entre las poblaciones) y la matriz de distancia geográfica, con valores $R^2 = 0.98$ para los valores F_{ST} y $R^2 = 0.96$ para los valores π , en ambos se observó significancia estadística. La figura 9 muestra los gráficos de la prueba.

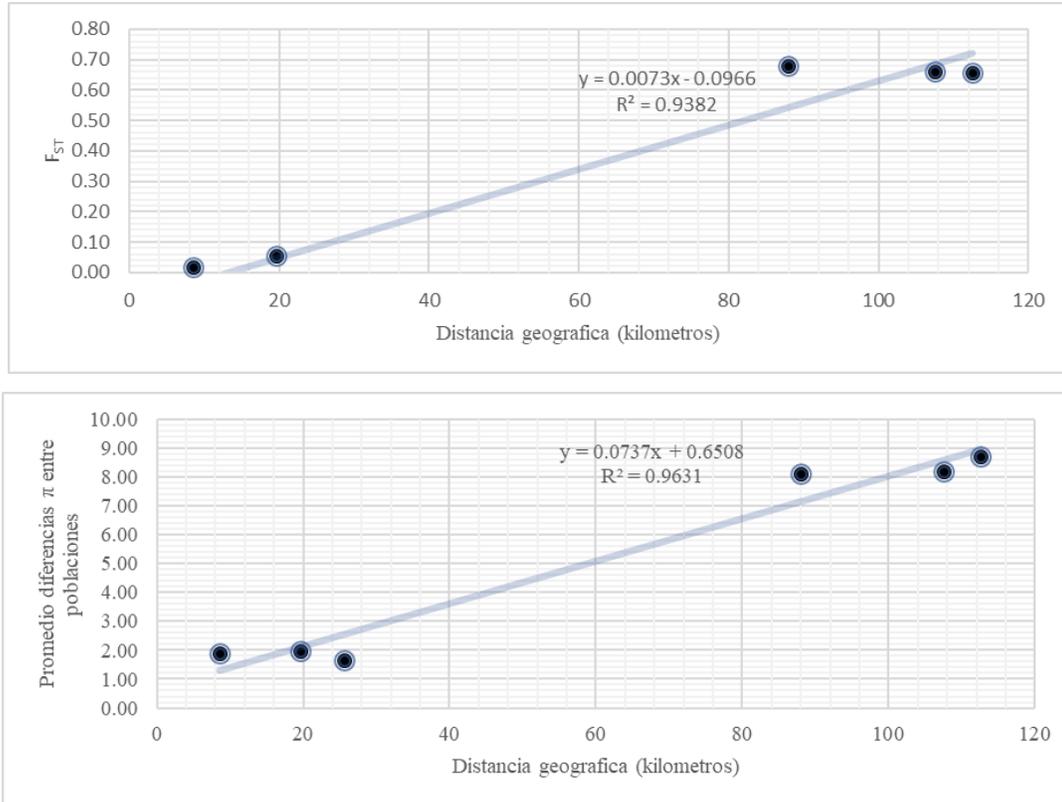


Figura 9: Graficas de la prueba de Mantel. a) Relación entre los índices de fijación F_{ST} y la distancia geográfica. b) Relación entre la Distancia de Nei D y la distancia geográfica.

Mapa de haplotipos

El mapa de haplotipos evidencia la estructuración genética de las poblaciones estudiadas. En el lado izquierdo del mapa se muestran los nueve haplotipos pertenecientes a las poblaciones del occidente del país, con un alto grado de interconexión y similitud, teniendo en promedio un salto mutacional de diferencia entre ellos. Las poblaciones de la Laguna de las Ninfas y el Cerro Verde presentaron cada una dos haplotipos privados, la población de las Cascadas de don Juan comparte sus haplotipos con las poblaciones anteriormente mencionadas, el mapa también sugiere la existencia de tres haplotipos no muestreados, los cuales ayudan a explicar la interrelación de estas poblaciones. El lado derecho del mapa muestra los 5 haplotipos pertenecientes al Volcán de San Vicente, siendo estos exclusivos de esta población en su totalidad, el haplotipo 13 muestra un distanciamiento notable al resto, presentando en 6 mutaciones respecto al haplotipo 12. El mapa de haplotipos se muestra en la figura 10. La composición y frecuencia de los haplotipos se muestra en los anexos 3 y 4.

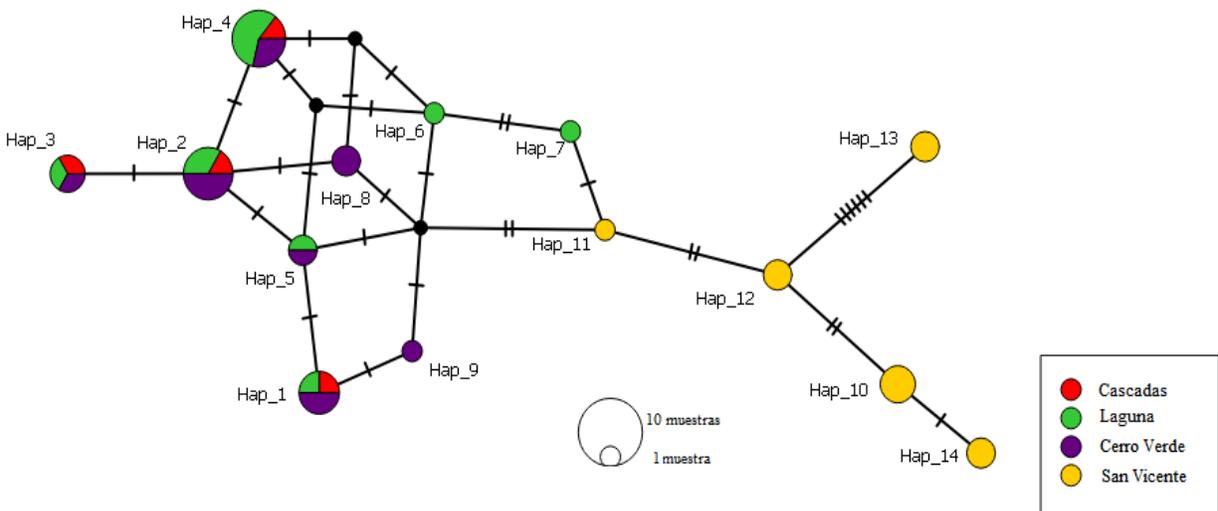


Figura 10: Mapa de los haplotipos identificados, los cortes perpendiculares en la unión de vértices representan el número de saltos mutacionales entre estos, los vértices negros representan haplotipos no muestreados, se especifica el tamaño relativo de los nodos y el color en el que se representa cada población.

Árbol filogenético.

El árbol filogenético obtenido (figura 11) confirma el patrón observado en el mapa de haplotipos, separando a los haplotipos en dos ramas. En la superior, se muestran las secuencias de cuatro de los cinco haplotipos presentes en el Volcán de San Vicente (Haplotipos 10, 12, 13 y 14), mientras que en la rama inferior se muestran las secuencias de los haplotipos pertenecientes a las poblaciones del occidente del país (Haplotipos del 1 al 9) y del haplotipo 11 de San Vicente. El largo de las ramas nos muestra como las diferencias dentro de la población de San Vicente es mayor al resto de poblaciones, confirmando lo observado en la figura 8.

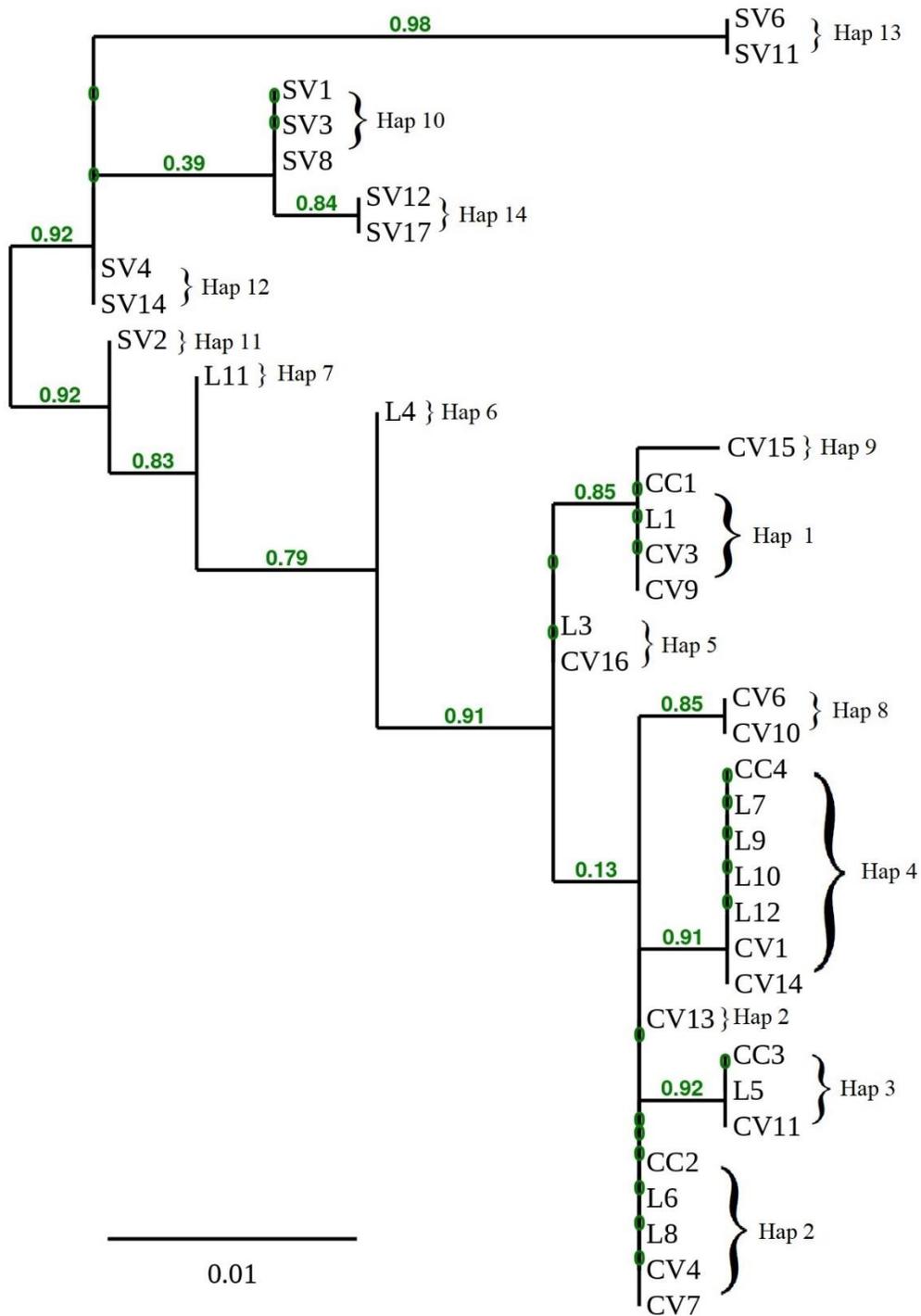


Figura 11: Árbol filogenético de los individuos muestreados realizado con el método de máxima parsimonia y el modelo de mutación HKY85, los corchetes indican los haplotipos a los cuales pertenecen las secuencias, los números en verde muestran el porcentaje de confiabilidad en la colocación de cada rama.

DISCUSIÓN

Índices de diversidad genética.

Diversidad nucleotídica y haplotípica.

Los valores de diversidad nucleotídica de la región ITS2 en *Quercus skinneri* Benth. variaron considerablemente entre las diferentes poblaciones. La población del Cerro Verde presentó el valor más bajo de diversidad nucleotídica, lo que podría explicarse por el alto grado de intervención humana en el sitio, declarado como turicentro del Instituto Salvadoreño de Turismo en el año 1955, siendo este el único sitio de muestreo con estas características (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales, 2004). Las intervenciones antropogénicas en la estructura y composición del paisaje pueden afectar negativamente la diversidad genética de una población como lo demuestra Soares et al. (2019).

Los haplotipos presentes en las Cascadas de don Juan están presentes en las poblaciones del Cerro Verde y de la Laguna de las Ninfas, por lo que cobra sentido el valor medio de diversidad nucleotídica que presenta esta población.

La mayor diversidad nucleotídica se encontró en la población del volcán de San Vicente, que, a pesar de ser la población más aislada, presenta un valor de $\pi=0.0124$, aproximadamente el doble que la media del resto de poblaciones, teniendo también las secuencias más disímiles entre sí (ver figura 7). Aclarando que la región ITS2 es una región neutral, por lo que no es posible realizar análisis demográficos a partir de esta, sin embargo, la alta diversidad presente en esta población podría ser explicada mediante el fenómeno conocido como “sobre dominancia asociativa”, el cual permite el mantenimiento de una alta diversidad genética en poblaciones pequeñas y/o fragmentada (Pamilo et al., 1998) en contradicción de la deriva génica. Estudios realizados por Schou et al. (2017) y Fraser (2017) encontraron que la dominancia asociativa es especialmente efectiva manteniendo la diversidad genética cuando las poblaciones pasan por un evento de cuello de botella, para luego recuperar su tamaño rápidamente.

Dicha observación es compatible con las condiciones específicas del volcán de San Vicente, el cual ha sido afectado por erupciones propias y de volcanes vecinos, como la erupción de la caldera Ilopango en el año 431 e.c. (Major et al., 2001); ya que, a pesar de estas condiciones reducirían la

población de *Q. skinneri* presente en el sitio, estas podrían mantener su diversidad genética por medio de la dominancia asociativa, y la identidad de sus haplotipos como consecuencia del aislamiento geográfico al que se somete esta población.

A nivel general, el valor de diversidad nucleotídica fue de $\pi=0.0149$, siendo éste mayor a los presentes en *Q. ilex* L. y *Q. coccifera* L. para la misma región genética (Simeone et al., 2013), estos presentaron valores de $\pi=0.01022$ y $\pi=0.00595$, respectivamente. En este, los autores analizaron un árbol por sitio, ubicando los sitios en un amplio rango geográfico, incluyendo a Italia, Croacia, Marruecos, España e Israel para *Q. ilex* L. y a Italia, Croacia, Turquía, Portugal e Israel para *Q. coccifera* L.

Estructura genética.

El Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) confirma, con un valor p de 0.001, la existencia de una estructuración genética, indicando que el 56.77% de la variación en *Q. skinneri* Benth. se debe a diferencias entre las poblaciones.

Las comparaciones por pares de los valores de F_{ST} , mostraron una diferenciación genética significativa entre la población de San Vicente con las del occidente del país, reportando valores altos (entre 0.657 y 0.680), distanciando así a esta población del resto. Datos similares de diferenciación fueron reportados para poblaciones de *Q. gilva* Blume. distribuidas en Japón y Taiwán, con valores F_{ST} de 0.668 y 0.780, respectivamente, los autores consideran que estos valores representan una alta diferenciación entre las dos poblaciones (Sugiura et al., 2015).

Por el contrario, las poblaciones de las Cascadas de don Juan, Laguna de la Ninfas y Cerro Verde presentan valores F_{ST} bastante bajos entre sí (de -0.022 a 0.056), denotando la ausencia de una diferenciación genética importante entre estas. Estos valores bajos se asemejan a los observados en poblaciones de otras especies del género con una distribución geográfica continua, como en *Q. liaotungensis* Camus. ($F_{ST}=0.033$), *Q. variabilis* Blume. ($F_{ST}=0.063$), *Q. robur* L. ($F_{ST}=0.080$) y *Q. mongólica* Fisch. ($F_{ST}=0.077$) (Shi et al., 2017; Guo et al., 2021).

En el caso del género *Quercus*, cuyo principal método de dispersión es anemófilo, se entiende como migrantes o migración al flujo de genes mediado por la dispersión del polen entre poblaciones diferentes, en donde, los padres logran reproducirse efectivamente (Ashley, 2021).

Varios estudios han demostrado que en poblaciones fragmentadas de tamaño reducido e incluso en poblaciones de bosques continuos los mecanismos reproductivos en este género favorecen la fertilización por polen de individuos pertenecientes de afuera de sus fragmentos y no de individuos vecinos (Craft y Ashley 2010; Ortego et al. 2014).

La estructuración observada en este estudio coincide con los valores de flujo genético observados (tabla 5), tomando, para las poblaciones del occidente del país, valores entre 8.34 y 27.26. Estos son aún mayores que los valores reportados en *Q. potosina* (3.76), *Q. crassifolia* (6.7) *Q. Liaotungensis* (11.2); estudios que fueron realizados en poblaciones continuas donde se identificó alta conectividad por flujo genético (Alfonso-Corrado et al., 2004; Gorgonio-Ramírez et al., 2017; Guo et al., 2021), por lo tanto, la población de occidente de *Q. skinneri* presenta un comportamiento similar a los estudios previamente mencionados. Debido a esto, se considera que las poblaciones de las Cascadas de Don Juan, Laguna de las Ninfas y Cerro Verde, forman una sola población desde el punto de vista genético.

El análisis de F_{ST} coalescentes confirma lo anteriormente dicho, ya que, nos muestra como el tiempo relativo de coalescencia entre la población del volcán de San Vicente y las poblaciones de occidente es más de 30 veces mayor con respecto a los tiempos relativos de coalescencia entre las poblaciones del occidente del país. Esto nos indica la existencia de divergencia genética entre la población de San Vicente con el resto de poblaciones del país, debido a la separación de estas poblaciones en un tiempo remoto, y a la vez confirma que las tres poblaciones del occidente del país se comportan como una sola población. Lo anterior podría deberse a la falta de conectividad que tiene este volcán con otras elevaciones de importancia, en las que se den las condiciones adecuadas para la presencia de *Q. skinneri*, siendo las elevaciones más cercanas el volcán de San Salvador, ubicado a 47 km al occidente, y la cordillera Tecapa - Chinameca, ubicada a 40 km al oriente.

Buschbom et al. (2011) determino que en poblaciones fragmentadas de *Q. robur*, al menos el 35% de los árboles fueron fecundados por polen proveniente de otros fragmentos, ubicados a 80 km de distancia. Un estudio similar, identificó la dispersión de polen a una distancia de 30 km en *Q. ilex* (Hampe et al., 2013). Esta forma de dispersión a larga distancia propicia el flujo genético entre poblaciones, ayudando a mantener la interconectividad en las poblaciones fragmentadas y por lo tanto, su integridad genética (Ashley et al., 2015). Una de las características más distintivas de *Q.*

skinneri Benth., es que posee bellotas de gran tamaño, lo que, al igual que con otras especies de robles con bellotas grandes, limita la dispersión de estas a pocos metros de distancia (Alfonso-Corrado et al. 2004), por lo que en esta especie, el polen toma mayor importancia en la dispersión del material genético (Dow y Ashley, 1998). Esto concuerda con la homogeneidad y flujo genético observado en las poblaciones de occidente, no obstante, los datos reflejan un flujo genético nulo entre las poblaciones de occidente con la población de San Vicente, por lo que, la distancia geográfica entre estas parece limitar la eficacia en sus estrategias reproductivas. La prueba de Mantel indica una alta correlación entre las distancias genéticas y la distancia geográfica entre las poblaciones de *Q. skinneri* Benth, incluidas en este estudio ($R^2= 0.98$ para los valores F_{ST} y $R^2=0.96$ para los valores π).

Nos encontramos con el hecho que la población de San Vicente es una población pequeña, reproductivamente aislada de la población de occidente y que se ha mantenido genéticamente aislada de esta por un tiempo significativo, como demuestran los valores de F_{ST} coalescentes. Con esto, podemos suponer que se han dado las condiciones adecuadas para que la deriva genética tenga un efecto significativo en la estructura genética de esta población, mediante la fijación de nuevos haplotipos. Lo anteriormente explicado puede observarse de forma gráfica en el mapa de haplotipos y árbol filogenético (figuras 8 y 9), donde la población de San Vicente se separa claramente del resto, dado que todos sus haplotipos son privados, demostrando que ha transcurrido el tiempo suficiente para que las mutaciones hayan llegado a fijarse.

De igual forma podemos observar que el haplotipo 11 (individuo SV2) guarda mayor similitud genética con el haplotipo 7, presente en la Laguna de las Ninfas, que con los demás haplotipos del Volcán de San Vicente, esto evidencia la existencia de un flujo de genes en el pasado entre estas poblaciones, o, que ambas poblaciones descienden de una misma población ancestral.

Considerando el origen septentrional del género, la riqueza de la sección Lobatae en la región mesoamericana, y la distribución actual de *Q. skinneri*, como se muestra en la figura 2, tiene sentido suponer que las poblaciones de este estudio se originaron en la Sierra Madre de Chiapas, al noroeste del país, y que la estructuración genética observada puede ser explicada por la interconexión de la zona occidental con la Sierra Madre de Chiapas, y el aislamiento geográfico del Volcán de San Vicente con respecto a esta, además, de la destrucción de bosques primarios en

nuestro territorio, causando una mayor fragmentación en los robledales propios de El Salvador (Lauer, 1954; Major et al., 2004; Dull, 2008)

CONCLUSIONES

El valor total de diversidad genética en la región ITS2 de las poblaciones de *Quercus skinneri* Benth. analizadas en el presente estudio fue mayor al reportado para las especies de distribución templada *Q. ilex* L. y *Q. coccifera* L. A nivel local, la población presente en el volcán de San Vicente mostró ser la población con el valor de diversidad genética más alto y el mayor número de haplotipos privados.

Las poblaciones Cascadas de Don Juan, Laguna de las Ninfas, y Cerro Verde, ubicadas al occidente del país, se comportan como una sola población desde el punto de vista genético, existiendo una conectividad reproductiva entre ellas. Esto puede explicarse por la polinización anemófila a larga distancia que presenta el género, y la cercanía geográfica entre las poblaciones.

La diferenciación genética de la población de San Vicente, con respecto a las poblaciones de occidente, está relacionada directamente con su distanciamiento geográfico, como muestra la prueba de Mantel, el cual impide la conectividad reproductiva entre estas poblaciones. Sin embargo, se puede observar la existencia de haplotipos cercanos entre las poblaciones del Volcán de San Vicente y La Laguna de las Ninfas, lo que podría indicar que, en tiempos pasados, pudo haber existido conectividad entre estas poblaciones, o, en su defecto, que ambas poblaciones descienden de una misma población ancestral.

Desde el punto de vista filogenético, individuos de *Q. skinneri* Benth. estudiados se dividen en dos grupos. Esto se corresponde con la estructuración genética inferida de los índices F_{ST} . $F_{ST\ coal}$, Da y con lo observado en el mapa de haplotipos.

RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso de la región ITS2 para el estudio de diversidad y estructura genética en especies vegetales, ya que evidencia patrones a escala intraespecífica en poblaciones distribuidas en un espacio geográfico reducido.

Los valores reportados en este estudio representan únicamente a individuos adultos, por lo que se recomienda realizar estudios genéticos que incluyan plántulas para poder determinar el flujo genético actual y el estado genético de las futuras generaciones.

Adicionar el uso de marcadores moleculares no neutrales, que permitan la realización de análisis para conocer la historia demográfica de las poblaciones, así como, si estas están sometidas a diferentes presiones adaptativas.

Realizar un estudio más amplio en el que se incluyan poblaciones de la zona oriental del país, que puedan dar una explicación más completa al patrón genético observado en este estudio, y que, además, incluya el análisis morfológico y fenológico de la especie.

En la actualidad, se considera que la conservación de la diversidad biológica inicia desde el componente genético, por lo que, la población de *Quercus skinneri* Benth. presente en el volcán de San Vicente es de importancia prioritaria para la conservación de la especie, ya que no sólo contiene la mayor diversidad genética observada en este estudio, sino que también, es única para esta población.

Debido al poco conocimiento del género *Quercus* en nuestro país, la gran variabilidad morfológica que presenta *Q. skinneri* Benth., así como, otras especies cercanamente emparentadas del grupo Acutifoliae a lo largo de su distribución y los complejos patrones evolutivos que caracterizan al género; es importante considerar la posibilidad que la diferenciación genética de la población del Volcán de San Vicente sea evidencia de la existencia de otra especie de este grupo en El Salvador, por lo que se recomienda llevar a cabo estudios genéticos con el objetivo de diferenciar e identificar las especies presentes en El Salvador.

BIBLIOGRAFÍA

Alfonso-Corrado C, Esteban-Jiménez R, Clark-Tapia R, Piñero D, Campos JE, Mendoza A. 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). *Evol Ecol*. 18(5–6):585–599. doi:10.1007/s10682-004-5145-5.

Alianza para la Conservación de los Bosques de Pino-Encino de Mesoamérica. 2008. Plan de Conservación de los Bosques de Pino-Encino de Centroamérica y el Ave Migratoria *Dendroica chrysoparia*. Pérez ES, Secaira E, Macías C, Morales S, Amezcua. e I, Fundación Defensores de la Naturaleza, The Nature Conservancy, editores.

Altamirano M, Yáñez P. 2016. El código de barras de ADN (barcoding): una herramienta para la investigación y conservación de la diversidad biológica en Ecuador. *La Granja*. 23(1). doi:10.17163/lgr.n23.2016.01.

<http://revistas.ups.edu.ec/index.php/granja/article/view/23.2016.01>.

Ashley M V. 2021. Answers blowing in the wind: A quarter century of genetic studies of pollination in oaks. *Forests*. 12(5). doi:10.3390/f12050575.

Ashley M V., Abraham ST, Backs JR, Koenig WD. 2015. Landscape genetics and population structure in Valley Oak (*Quercus lobata* Née). *Am J Bot*. 102(12):2124–2131. doi:10.3732/AJB.1500182. [consultado 2022 feb 19]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26672009/>.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 16(1):37–48. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036. [consultado 2022 feb 8]. <https://academic.oup.com/mbe/article/16/1/37/993192>.

Berendsohn W., Gruber A., Monterrosa Salomón J. 2009. *Nova Silva Cuscatlanica. Árboles nativos e introducidos de El Salvador. Parte 1: Angiospermae – Familias A a L*. Berlin-Dahlem: BGBM. <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>.

Berendsohn WG, Gruber AK, Salomón JM. 2012. *Nova Silva Cuscatlanica. Árboles nativos e introducidos de El Salvador. Parte 2: Angiospermae - Familias M a P y Pteridophyta*. Englera.

Buschbom J, Yanbaev Y, Degen B. 2011. Efficient long-distance gene flow into an isolated relict oak stand. *J Hered.* 102(4):464–472. doi:10.1093/JHERED/ESR023. [consultado 2022 feb 22]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525180/>.

Cassens I, Mardulyn P, Milinkovitch MC. 2005. Evaluating Intraspecific “Network” Construction Methods Using Simulated Sequence Data: Do Existing Algorithms Outperform the Global Maximum Parsimony Approach? *Syst Biol.* 54(3):363–372. doi:10.1080/10635150590945377. [consultado 2022 feb 8]. <https://academic.oup.com/sysbio/article/54/3/363/1725939>.

Chen S, Yao H, Han J, Liu C, Song J, Shi L, Zhu Y, Ma X, Gao T, Pang X, et al. 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One.* 5(1):1–8. doi:10.1371/journal.pone.0008613.

Craft KJ, Ashley M V. 2010. Pollen-mediated gene flow in isolated and continuous stands of bur oak, *Quercus macrocarpa* (Fagaceae). *Am J Bot.* 97(12):1999–2006. doi:10.3732/AJB.0900390. [consultado 2022 feb 19]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3732/ajb.0900390>.

Dow BD, Ashley M V. 1998. High levels of gene flow in bur oak revealed by paternity analysis using microsatellites. *J Hered.* 89(1):62–70. doi:10.1093/jhered/89.1.62. [consultado 2022 mar 6]. <https://academic.oup.com/jhered/article/89/1/62/854066>.

Ducousso A, Michaud H, Lumaret R. 1993. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Ann des Sci For.* 50(Supplement):91s-106s. doi:10.1051/FOREST:19930708.

Dull RA. 2008. Unpacking El Salvador’s ecological predicament: Theoretical templates and “long-view” ecologies. *Glob Environ Chang.* 18(2):319–329. doi:10.1016/j.gloenvcha.2008.03.002.

Ellstrand NC, Elam DR. 1993. Population Genetic Consequences of Small Population Size: Implications for Plant Conservation. *Annu Rev Ecol Syst.* 24(1):217–242. doi:10.1146/annurev.es.24.110193.001245.

Ersts PJ. Geographic Distance Matrix Generator(version 1.2.3). Am Museum Nat Hist Cent Biodivers Conserv. [consultado 2022 ene 22]. http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg.

Ewing B, Green P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* 8(3):186–194. doi:10.1101/gr.8.3.186.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2017. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis: <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>. doi:10.1177/117693430500100003.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*. doi:10.5962/bhl.title.86657.

Fazekas AJ, Kuzmina ML, Newmaster SG, Hollingsworth PM. 2012. DNA barcoding methods for land plants. *Methods Mol Biol*. doi:10.1007/978-1-61779-591-6_11.

Feng S, Jiang M, Shi Y, Jiao K, Shen C, Lu J, Ying Q, Wang H. 2016. Application of the Ribosomal DNA ITS2 Region of *Physalis* (Solanaceae): DNA Barcoding and Phylogenetic Study. *Front Plant Sci*. 7(2016JULY). doi:10.3389/FPLS.2016.01047. [consultado 2022 nov 14]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27486467/>.

Feng S, Jiang Y, Wang S, Jiang M, Chen Z, Ying Q, Wang H. 2015. Molecular Identification of *Dendrobium* Species (Orchidaceae) Based on the DNA Barcode ITS2 Region and Its Application for Phylogenetic Study. *Int J Mol Sci* 2015, Vol 16, Pages 21975-21988. 16(9):21975–21988. doi:10.3390/IJMS160921975. [consultado 2022 nov 14]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/9/21975/htm>.

Fernández JF, Sork VL, Gallego G, López J, Bohorques A, Tohme J. 2000. Cross-Amplification of Microsatellite Loci in a Neotropical *Quercus* Species and Standardization of DNA Extraction from Mature Leaves Dried in Silica Gel. *Plant Mol Biol Report*. 18(4). doi:<https://doi.org/10.1007/BF02825070>.

Frankham R, Ballau JD, Briscoe DA. 2012. *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd Editio. New York.

Frankham R, Ballou J, Briscoe D. 2010a. *Introduction to Conservation Genetics*. 2nd ed. Cambridge University Press.

Frankham R, Ballou J, Briscoe D. 2010b. *Introduction to Conservation Genetics*.

Fraser DJ. 2017. Genetic diversity of small populations: Not always “doom and gloom”? doi:10.1111/mec.14371.

Fundación Socioeconómica y Restauración Ambiental, Fondo de Inversión Natural de El Salvador. 2016. PLAN DE DESARROLLO LOCAL SOSTENIBLE RESERVA DE BIOSFERA APANECA- ILAMATEPEC 2016-2031. San Salvador.

Gao T, Yao H, Song J, Liu C, Zhu Y, Ma X, Pang X, Xu H, Chen S. 2010. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *J Ethnopharmacol.* 130(1):116–121. doi:10.1016/J.JEP.2010.04.026.

Goodall-Copestake WP, Tarling GA, Murphy EJ. 2012. On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity* (Edinb). 109(1):50–56. doi:10.1038/hdy.2012.12. <http://dx.doi.org/10.1038/hdy.2012.12>.

Gorgonio-Ramírez M, Tapia RC, Campos JE, Reyes AM, Corrado CA. 2017. Diversity and genetic structure of *quercus crassifolia* in managed forest and local use sites in sierra Juárez, Oaxaca. *Madera Bosques.* 23(2):85–98. doi:10.21829/myb.2017.2321122.

Gu W, Song J, Cao Y, Sun Q, Yao H, Wu Q, Chao J, Zhou J, Xue W, Duan J. 2013. Application of the ITS2 Region for Barcoding Medicinal Plants of Selaginellaceae in Pteridophyta. *PLoS One.* 8(6). doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0067818. [consultado 2022 nov 14]. </pmc/articles/PMC3694882/>.

Guo B, Hao X, Han L, Zhai Y, Zhou S, Chen S, Ren D, An X. 2021. Unraveling the genetic diversity and structure of *Quercus liaotungensis* population through analysis of microsatellite markers. *PeerJ.* 9:e10922. doi:10.7717/peerj.10922. <https://peerj.com/articles/10922>.

Hamilton MB. 2009. *Population Genetics*. 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

Hampe A, Pemonge MH, Petit RJ. 2013. Efficient mitigation of founder effects during the establishment of a leading-edge oak population. *Proc R Soc B Biol Sci.* 280(1764). doi:10.1098/RSPB.2013.1070. [consultado 2022 feb 22]. <https://royalsocietypublishing.org/doi/abs/10.1098/rspb.2013.1070>.

Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of Population Genetics*. 3rd ed. Sinauer Associates.

Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc B Biol Sci.* 270(1512):313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.

- Holderegger R, Kamm U, Gugerli F. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: Implications for landscape genetics. *Landsc Ecol.* 21(6):797–807. doi:10.1007/s10980-005-5245-9.
- Janzen DH. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12794–12797. doi:10.1073/pnas.0905845106.
- Klug, William S., Cummings, Michael R., Spencer CA. 2006. *Concepts of Genetics*. 8th ed. Upper Saddle River, NJ: Pearson Education International.
- Lauer W. 1954. Las formas de la vegetacion de El Salvador. *Rev Comun.*:41–45.
- Lemoine F, Correia D, Lefort V, Doppelt-Azeroual O, Mareuil F, Cohen-Boulakia S, Gascuel O. 2019. NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Web Serv issue Publ online.* 47. doi:10.1093/nar/gkz303. <http://www.atgc-montpellier.fr/presto>.
- Li X, Yang Y, Henry RJ, Rossetto M, Wang Y, Chen S. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 90(1):157–166. doi:10.1111/brv.12104.
- Major JJ, Schilling SP, Pullinger CR, Escobar CD. 2004. Debris-flow hazards at San Salvador, San Vicente, and San Miguel volcanoes, El Salvador. *Spec Pap Geol Soc Am.* 375:89–108. doi:10.1130/0-8137-2375-2.89.
- Major JJ, Schilling SP, Pullinger CR, Escobar CD, Howell MM. 2001. Determinación de zonas de riesgo volcánico para el volcán San Vicente. :01–357.
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC. 1999. Phylogeny, Biogeography, and Processes of Molecular Differentiation in. *Mol Phylogenet Evol.* 12(3):333–349.
- Márquez L, Serrato A, Cerritos R. 2014. Secuenciación de fragmentos de ADN. En: *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos*. Primera Ed. México D.F. p. 231–249.
- McNeely JA, Miller KR, Reid W V., Mittermeier RA, Werner TB. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. 1st ed. Gland, Switzerland : IUCN ; Washington, DC : WRI, Conservation International, WWF-US, World Bank: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund-US, World Bank.

Meirmans PG. 2012. The trouble with isolation by distance. *Mol Ecol.* 21(12):2839–2846. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05578.x.

Milgroom M. 2015. *Population Biology of Plant Pathogens Genetics, Ecology and Evolution*. 1st ed. St. Paul, Minnesota: The American Phytopathological Society.

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2004. Plan de manejo del área natural Los Volcanes. San Salvador.

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 2018. *Inventario Nacional de Bosques de El Salvador*. (1st ed):426.

Mitton JB. 2013. *Gene Flow*. Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00589-1>.

Muller CH. 1942. *The Central American Species of Quercus*.

Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.

Nei M, Genetics P. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70(12):3321–3323. doi:10.1073/PNAS.70.12.3321. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665286>.

Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(10):5269. doi:10.1073/PNAS.76.10.5269.

Nixon K. 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Ann For Sci.* 50:25–34.

Nixon KC. 2006. Global and Neotropical Distribution and Diversity of Oak (genus *Quercus*) and Oak Forests. En: *Ecology and Conservation of Neotropical Montane Oak Forests*.

Ortego J, Bonal R, Muñoz A, Aparicio JM. 2014. Extensive pollen immigration and no evidence of disrupted mating patterns or reproduction in a highly fragmented holm oak stand. *J Plant Ecol.* 7(4):384–395. doi:10.1093/jpe/rtt049. [consultado 2022 feb 22]. <https://academic.oup.com/jpe/article/7/4/384/977254>.

Ortego J, Bonal R, Muñoz A, Espelta JM. 2015. Living on the edge: The role of geography and environment in structuring genetic variation in the southernmost populations of a tropical oak.

Plant Biol. 17(3):676–683. doi:10.1111/plb.12272.

Pamilo P, Snaebjörn &, Snaebjörn S, Alsson P'. 1998. Associative overdominance, heterozygosity and fitness. *Hered* 1998 814. 81(4):381–389. doi:10.1046/j.1365-2540.1998.00395.x. [consultado 2022 jun 13]. <https://www.nature.com/articles/6883950>.

Paz GM. 2012. Genetic variability of common oak (*Quercus humboldtii* Bonpl) in the “Macizo Colombiano” region. *Biotechnol en el Sect Agropecu y Agroindustrial*. 10(2):110–116.

Peña C. 2014. Métodos de inferencia filogenética *Métodos de inferencia filogenética*. 18(August 2011):265–267. doi:10.15381/rpb.v18i2.243.

Phillips JD, Gillis DJ, Hanner RH. 2019. Incomplete estimates of genetic diversity within species: Implications for DNA barcoding. *Ecol Evol*. 9(5):2996–3010. doi:10.1002/ece3.4757.

Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha-Olivares A, Lizana RS. 2008a. El conocimiento de la variabilidad genética. En: *Capital natural de México Vol I Conocimiento actual de la Biodiversidad*. p. 415–435.

Piñero D, Barahona A, Eguiarte L, Rocha-Olivares A, Lizana RS. 2008b. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital natural de México Vol I Conocimiento actual de la Biodiversidad*. p. 415–435.

Rodríguez-Acosta M, Coombes AJ. 2020. Manual para la propagación de *Quercus*: Una guía fácil y rápida para cultivar encinos en México y América Central. :79.

Romero Rangel S. 2006. REVISIÓN TAXONÓMICA DEL COMPLEJO ACUTIFOLIAE DE QUERCUS (FAGACEAE) CON ÉNFASIS EN SU REPRESENTACIÓN EN MÉXICO. *Acta Bot Mex*. 76:1–45.

Rozas J, Rozas R. 2018. DnaSP DNA sequence polymorphism Version 6.12. :112.

Schou MF, Loeschke V, Bechsgaard J, Schlötterer C, Kristensen TN. 2017. Unexpected high genetic diversity in small populations suggests maintenance by associative overdominance. *Mol Ecol*. 26(23):6510–6523. doi:10.1111/mec.14262.

Shi X, Wen Q, Cao M, Guo X, Xu LA. 2017. Genetic diversity and structure of natural *Quercus variabilis* population in China as revealed by microsatellites markers. *Forests*. 8(12):1–16.

doi:10.3390/f8120495.

Simeone MC, Piredda R, Papini A, Vessella F, Schirone B. 2013. Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): Problems, prospects and phylogenetic implications. *Bot J Linn Soc.* 172(4):478–499. doi:10.1111/boj.12059.

Slatkin M. 1995. A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies. *Genetics.* 139(4):57–462.

Soares LASS, Cazetta E, Santos LR, França D de S, Gaiotto FA. 2019. Anthropogenic Disturbances Eroding the Genetic Diversity of a Threatened Palm Tree: A Multiscale Approach. *Front Genet.* 10. doi:10.3389/FGENE.2019.01090/FULL. [consultado 2022 jun 13]. /pmc/articles/PMC6855268/.

Sugiura N, Tang D, Kurokochi H, Saito Y, Ide Y. 2015. Genetic structure of *Quercus gilva* Blume in Japan as revealed by chloroplast DNA sequences. *Botany.* 93(12):873–880. doi:10.1139/cjb-2015-0025.

W Hedrick P. 2011. *Genetics of Populations.* 4th ed. Jones and Barlett Publishers.

Wakeley J. 2008. *Coalescent Theory: An Introduction.* Primera ed. Greenwood Village: Roberts and Company.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. ESTIMATING F-STATISTICS FOR THE ANALYSIS OF POPULATION STRUCTURE'. *Evolution (N Y).* 38(6):1358–1370.

Whitlock MC. 2011. $G'ST$ and D do not replace FST . *Mol Ecol.* 20(6):1083–1091. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04996.x.

Wright S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics.*(28):114–138. doi:10.1006/rwgn.2001.1426.

Wright S. 1949. The Genetical Structure of Populations. *An Hum Genet.* 15(1):323–354. doi:10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x.

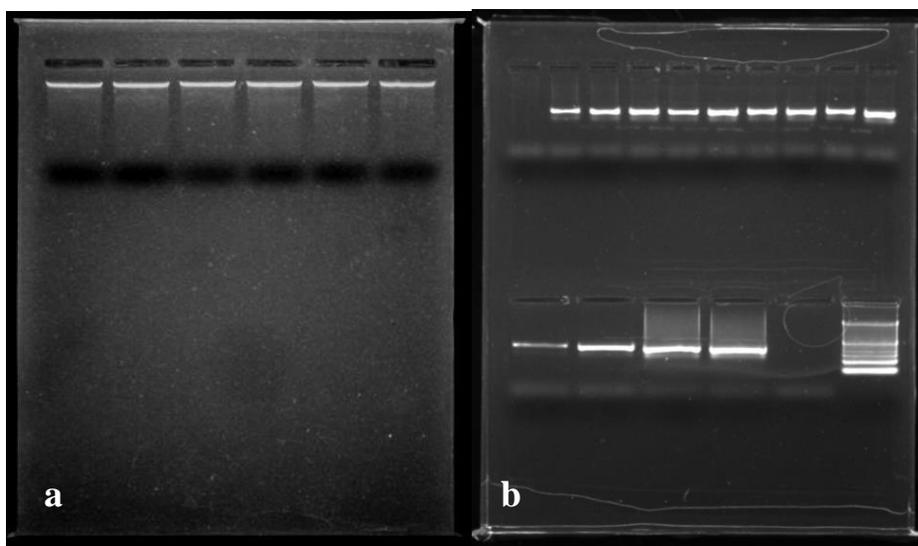
Xu J, Deng M, Jiang XL, Westwood M, Song YG, Turkington R. 2015. Phylogeography of *Quercus glauca* (Fagaceae), a dominant tree of East Asian subtropical evergreen forests, based on three chloroplast DNA interspace sequences. *Tree Genet Genomes.* 11(1). doi:10.1007/s11295-014-0805-2.

ANEXOS.

Anexo 1: Protocolo de extracción

- 1) Colocar 50 mg de tejido seco pulverizado en un tubo para microcentrífuga de 2 ml.
- 2) Agregar 1 ml de buffer de extracción al tubo, mezclar con vortex e incubar a 60°C durante 30 minutos.
- 3) Agregar 700 μ l de CI (24:1), mezclar hasta emulsionar.
- 4) Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos.
- 5) Retirar ~650 μ l del sobrenadante, colocar en un nuevo tubo y agregar 500 μ l de CI, mezclar hasta emulsionar.
- 6) Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos.
- 7) Retirar ~550 μ l del sobrenadante y colocar en un nuevo tubo de 1.5ml.
- 8) Agregar 1 volumen de isopropanol, mezclar y centrifugar a 8,000 rpm durante 5 minutos.
- 9) Enjuagar con etanol 70° dos veces y dejar secar por 1 hora.
- 10) Re suspender en 50-200 μ l de agua ultra pura.

Anexo 2: Electroforesis de comprobación de calidad en gel de agarosa.



- a) Electroforesis para la comprobación de la calidad del ADN genómico extraído de las muestras foliares. b) Electroforesis de productos de PCR de la región ITS2.

Anexo 3: Posicionamiento y cambios en la secuencia de los 14 haplotipos detectados a nivel general.

Sitios polimórficos, gen ITS2																	
Número de par de base	22	46	60	67	71	89	92	121	124	154	155	158	159	189	192	207	225
Haplotipo 1	T	G	A	G	G	A	C	G	G	A	T	G	A	C	G	G	A
Haplotipo 2	G	G
Haplotipo 3	G	A	G
Haplotipo 4	.	.	G	.	.	G	G
Haplotipo 5	G
Haplotipo 6	.	.	G	.	.	G	A
Haplotipo 7	.	.	G	.	.	G	.	.	.	G	C	A
Haplotipo 8	G	A	G
Haplotipo 9	A
Haplotipo 10	C	G	.	A	A	G	C	A	G
Haplotipo 11	G	.	.	.	G	C	A
Haplotipo 12	C	G	.	.	.	G	C	A	G
Haplotipo 13	C	A	.	A	A	G	T	.	.	G	C	A	G	A	A	.	.
Haplotipo 14	C	.	.	.	A	G	.	A	A	G	C	A	G

Anexo 4: Frecuencia de haplotipos por sitio de muestreo.

<i>Frecuencia haplotípica por sitio de muestreo</i>					
<i>Sitio de muestreo</i>	Cascadas de don Juan	Laguna de las Ninfas	Cerro Verde	Volcán de San Vicente	Total
Haplotipo 1	1	1	2	-	4
Haplotipo 2	1	2	3	-	6
Haplotipo 3	1	1	1	-	3
Haplotipo 4	1	4	2	-	7
Haplotipo 5	-	1	1	-	2
Haplotipo 6	-	1	-	-	1
Haplotipo 7	-	1	-	-	1
Haplotipo 8	-	-	2	-	2
Haplotipo 9	-	-	1	-	1
Haplotipo 10	-	-	-	3	3
Haplotipo 11	-	-	-	1	1
Haplotipo 12	-	-	-	2	2
Haplotipo 13	-	-	-	2	2
Haplotipo 14	-	-	-	2	2