



República Bolivariana de Venezuela
Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología
Instituto Jardín Botánico de Mérida

Variabilidad genética intra-poblacional de *Chusquea guirigayensis* Niño, L. G. Clark & Dorr, en el Páramo Piedras Blancas - Los Romeros (Mérida, Venezuela)

Proyecto de Trabajo Especial de Grado para optar por el Título de Licenciado en Biología

Autor: Román David González Mora
Tutor: Dra. Francisca Ely
Asesor: Dr. Gustavo Fermín Muñoz

Mérida, Julio de 2018

www.bdigital.ula.ve

Este proyecto se llevó a cabo en el Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad molecular del Instituto Jardín Botánico de Mérida de la Universidad de los Andes.

Agradecimientos

A mis padres: Reinaldo y Adriana, porque me apoyaron incansablemente desde el primer momento en que decidí estudiar Biología, siempre estuvieron ahí para brindarme su guía, su apoyo, su paciencia y su amor. Mi padre con su infinita paciencia, bondad y sabiduría; siempre será mi mayor fuente de inspiración como biólogo, como ciudadano y como persona. Mi madre, prueba del trabajo duro, del carácter y del amor, siempre tuvo palabras para alentarme a continuar. Este es un logro de ustedes también.

A mi esposa, mi alma gemela, mi compañera, mi fuente de inspiración en muchos casos. Este logro es de ambos, de la familia González-Parada. Estuviste contribuyendo y ayudándome continuamente en el proyecto, con tu hermosa compañía, ideas, conocimiento y firmeza para corregir mis escritos, la más deliciosa comida, los hermosos sueños juntos, y en fin, al amor tan grande que nos tenemos. TE AMO

A la profesora Francisca Ely, mi tutora, mi segunda mamá. Gracias, porque desde el principio, sin conocerme, confió en mí para éste proyecto. Hoy en día sin su apoyo y esfuerzo no estaría aquí, haciendo cosas increíbles que ningún otro tutor haría. Gracias por formarnos con paciencia y cariño. Esperemos continuar en la maestría y desarrollar muchas más investigaciones juntos.

Al asesor de mi tesis: el profesor Gustavo Fermín. El mejor profesor que tuve durante la carrera, siempre estuvo estimulándome, corrigiéndome, apoyándome, hasta el punto de transformarse en más que un profesor, siendo en éste momento como mi segundo padre. Aunque se encuentre lejos, siempre lo llevo conmigo, esperando que nos reencontremos pronto. Mi mentor, mi maestro, mi profesor, mi modelo a seguir. Gracias por tanto apoyo y confianza.

A las profesoras Luz Thais y María Marcano, por aumentar mi amor por las plantas en esa increíble asignatura de Fisiología del Desarrollo. En especial a los profe Luz, por acompañarme siempre en esa curiosidad para realizar experimentos; además de la flexibilidad en las horas de preparaduría cuando tenía reunión con mis tutores

Al profesor Ascanio Rojas, por compartir e incentivar mi amor por la genética poblacional y la biogeografía de islas. A la profesora Masyelly Rojas, por corregirnos e incentivarnos a perseguir la excelencia como biólogos y como personas. Al profesor Jhonma Rondón, por leer mis manuscritos con tanta premura y a todos los demás profesores durante toda mi carrera.

A Jhony Márquez y al ICAE, por prestarme la ayuda logística para subir a Piedras Blancas a realizar el estudio, dispuesto a intentarlo nuevamente, inclusive después del mal sabor del fracaso.

A la Universidad de Los Andes por permitirme estudiar de manera gratuita, en una de las mejores universidades del mundo. Por brindarme la oportunidad de aprender tantas cosas, por formarme con sus increíbles profesores como un biólogo completo.

A mi Abuela Ligia Coronado y mi Tío Leonardo Mora. Mi abuela siempre escuchándome atentamente en todo momento, su sabiduría siempre me acercó a los mejores consejos para continuar trabajando, haciéndome entender que el amor más grande de las personas es el “darse”. Gracias abuela

por estar presente desde mi primer día de vida. Mi Tío Leonardo, mi primer mentor, mi más grande ayuda para entender teorías y artículos de biología, con un ingenio innato de científico que siempre será un biólogo de corazón, como el tipo de biólogo que todos deberíamos ser.

A mi hermana Nelyana y a mis sobrinos Daniel y Arantza, siempre estuvieron acompañándome con su amor y cariño, preguntando y preocupándose por mi licenciatura. A todo el resto de mi familia que siempre me apoyó de manera incansable durante mi carrera.

A mi cuñado Rolando, por ayudarme durante toda la tesis de manera incansable, con la instalación de los programas, edición de imágenes, llevándome a la facultad. Mi segundo hermano, mi pana, mis secuas, mi confidente. Gracias por escuchar mis conjeturas, aún cuando no entendieras nada del tema. Ahora a CELEBRAR!!

A la familia Parada-Puig por brindarme su apoyo, cariño, hospitalidad. Gracias por hacerme sentir como uno más de su familia, por siempre estar en disposición de ayudarme, por acogerme en su casa, por los consejos y toda su ayuda en los viajes y las salidas de campo. Los quiero muchísimo familia.

A mis amigos de siempre: Carlos, Eyisto, José, Andrés, Yonel, Topo, Sergio, Fabián. Gracias por tantos momentos riéndonos juntos, siempre apoyándome. Carlos, fuiste mi primer amigo desde precolar y siempre estuviste presente. Eyisto, gracias por tu fiel compañía a lo largo de toda la carrera, por tus consejos, por tu invaluable amistad.

A todos mis amigos y compañeros de carrera, en especial a José Torres (Tito), Jackeline Mendoza, Rosangelina Alvarado, Andrés León, Ricardo Carrasco, Edwin Parada, José Manuel Hoyos, Gamal Elhindawi, Greysa Barrios, Camilo Barrabás, Martha Rujano, Xavier Valero, Javier Herrera, Vicente González, Diego García, Mariana Gelambi, María Moreno, Fiorella Díaz, José Fernández, Yossmayer Rondón, Gabriela Navas, Génesis Moreno, Mary Selva Cuiñas. Tito gracias por acompañarme durante prácticamente toda la carrera, en las buenas y en las malas decisiones siempre estuviste ahí conmigo, estudiando, jugando, riendo en prácticamente todo. Andrés y Ricardo esperamos que el próximo viaje por Venezuela juntos dure un par de años en lugar de una semana, ambos son como mis hermanos. Jackeline, Rosa, Edwin, Gamal, Hoyos, Camilo, Xavier, Javier, Martha, numerosas fueron las noches de estudio juntos, gracias por ayudarme y acompañarme. María mi compañera de preparaduría, siempre cubriéndome las espaldas. Mary Selva, gracias por acompañarme en tantos PCRs.

A Tina Oliveira y a todos los profesores de la Red Genética para la Conservación edición 2018. Gracias por enseñarme tantas herramientas para la conservación de las especies. A mis compañeros en el curso, especialmente a Cecilia, Kily, Andres, Melyna, Samuel, Laura y muchos otros que siempre estuvieron conmigo durante el curso prestándome su apoyo, su amistad y cariño.

Y Finalmente, gracias a todos los que de una u otra manera contribuyeron con éste logro de mi vida. A los que no por menos importantes no menciono en estas líneas y a aquellos que quizá olvido. Gracias a todos.

Resumen

Venezuela ocupa el tercer lugar en Sudamérica en lo que respecta a la diversidad de bambúes leñosos. En este grupo destaca el género *Chusquea*, con el mayor número de especies y la distribución altitudinal más amplia en la región. *Chusquea* reúne especies que crecen desde ecosistemas montanos hasta el límite superior del páramo (800-4.010 m snm). *Chusquea guirigayensis* Niño, LG Clark y Dorr es una especie endémica de los Andes venezolanos, cuya distribución se limita a dos localidades en el páramo altiandino (3700-4000 m snm) de los estados Mérida (Páramo de los Romeros-Mifafí, Parque Nacional Sierra La Culata) y Trujillo (Monumento Nacional Guirigay-Teta de Niquitao). Dada la distribución tan restringida de la especie en el país y el aislamiento geográfico que existe entre las dos únicas poblaciones que la conforman, resulta de gran interés estudiar su diversidad genética intra-poblacional. Esta investigación estuvo dirigida a explorar la variabilidad genética poblacional de la especie en la localidad del Páramo Los Romeros y determinar la prevalencia de la reproducción sexual en dicha población, sabiendo que los bambúes son plantas clonales cuyos eventos de floración varían marcadamente en función de la forma de vida, hábitat y especie. Se muestrearon 22 macollas diferentes y se determinó la proporción de genets fértiles y vegetativos; de éstas se seleccionó una de mayor tamaño, en la cual se muestrearon a su vez 11 ramets diferentes. También se seleccionó un genet fértil en el cual se muestrearon ramets fértiles senescentes y vegetativos para determinar si los genets persisten pasado el evento de floración, en cuyo caso, se demostraría floración policárpica en la especie. Se realizaron extracciones de ADN de todas las muestras recolectadas, con el ADN extraído se realizaron amplificaciones mediante PCR con marcadores moleculares del tipo ISSR y *rpl16*. Los perfiles alélicos se analizaron utilizando los programas bioinformáticos POPGEN y ARLEQUIN. La diversidad genética se estimó en función de la proporción de haplotipos diferentes, número y porcentaje de loci polimórficos y diversidad genética poblacional, de acuerdo a los índices de Shannon-Wiener y Nei. Los resultados revelaron una alta incidencia de reproducción sexual en la especie, basados en la elevada proporción de genets fértiles (59%) y la alta diversidad de haplotipos diferentes en la población. La diversidad genética intra-poblacional estimada en función de la heterocigosidad esperada e índices de diversidad de Shannon, Tajima y Nei está en el rango típico de angiospermas con reproducción exclusivamente sexual. Los perfiles de haplotipos refleja un estrecho parentesco entre los 22 genets muestreados. Asimismo, se corroboró que *Chusquea guirigayensis* presenta una floración asincrónica, policárpica propia del subgénero *Swallenochloa*.

Palabras Clave: Bambusoideae, *Chusquinae*, ISSR, diversidad genética, endemismos, Venezuela

Índice General

1	Introducción	1
1.1	Características de los Bambúes	1
1.2	Clasificación, distribución y delimitación del género <i>Chusquea</i>	2
1.3	Sistemática actual de la especie <i>Chusquea guirigayensis</i>	4
1.4	Fenología reproductiva de los bambúes del género <i>Chusquea</i>: subg. <i>Swallemochloa</i>	6
1.5	Citogenética y genoma de los bambúes del género <i>Chusquea</i>	10
1.6	Fundamentos de la caracterización molecular con marcadores de tipo ISSR	11
1.7	Marcadores moleculares en estudios sistemáticos y poblacionales de bambúes leñosos .	14
2	Hipótesis	19
3	Objetivos.....	19
3.1	Objetivo General	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	Justificación	20
5	Metodología	20
5.1	Área de estudio	20
5.1.1	Páramo de Piedras Blancas-Páramo de los Romeros	20
5.2	Especie de estudio	22
5.2.1	Recolección del material genético de estudio	22
5.3	Análisis Molecular	24
5.3.1	Extracción de ADN	24
5.3.2	Marcadores moleculares empleados en el estudio	24
5.3.3	Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	25
5.3.4	Programas de PCR	26
5.3.5	Visualización de los productos de PCR	27
5.3.6	Análisis de la secuencia del intrón <i>rpl16</i> de <i>C. guirigayensis</i>	27
5.3.7	Análisis de las bandas obtenidas con los marcadores ISSRs amplificados por PCR	29
5.3.8	Transferibilidad y discriminación de los marcadores ISSR a nivel inter-especifico .	30
5.3.9	Análisis de la diversidad genética de <i>C. guirigayensis</i>	30
6	Resultados.....	33
6.1	Caracterización y estado fenológico de la población de <i>Chusquea guirigayensis</i> del Páramo de Piedras Blancas	33

6.2	Extracción del ADN y estandarización de PCR	36
6.2.1	Optimización de las reacciones de PCR (Concentración de ADN y Titulación con MgCl₂) 37	
6.3	Amplificación del intrón <i>rpl16</i> de <i>C. guirigayensis</i>	38
6.4	Alineamiento de la secuencia amplificada del intrón <i>rpl16</i> a partir de ADN de <i>Chusquea guirigayensis</i> con las secuencias de <i>Chusquea</i> depositadas en el GenBank	41
6.5	Segregación inter-específica de los marcadores ISSRs en especies del género <i>Chusquea</i> 43	
6.6	Diversidad genética intra-poblacional de <i>Chusquea guirigayensis</i> evaluada con los ISSRs como marcadores dominantes	44
6.6.1	Diversidad genética a nivel Poblacional (intra-poblacional)	46
6.6.2	Diversidad genética a nivel de Genet, tomando diferentes ramets en una misma macolla	47
6.6.3	Diversidad genética a nivel de coexistencia de ramets fértiles senescentes y vegetativos en un mismo genet	48
7	Discusión	53
7.1	Caracterización geográfica de la población de <i>C. guirigayensis</i> del Páramo de Piedras Blancas, sector Los Romeros-Mifafí en el Estado Mérida	53
7.1.1	Caracterización fenotípica y fenológica de los individuos de la población	53
7.1.2	Relación filogenética de <i>Chusquea guirigayensis</i> con otras especies del género <i>Chusquea</i> basado en la secuencia del intrón <i>rpl16</i>	55
7.2	Detección de segregación inter-específica y polimorfismo de los marcadores ISSR en especies del género <i>Chusquea</i>	56
7.3	Diversidad genética intra-poblacional de <i>C. guirigayensis</i>	58
8	Conclusiones	64
9	Recomendaciones	65
10	Bibliografía	66
11	Anexos	71

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Chusquea guirigayensis</i> en el Municipio Rangel, Páramo de Piedras Blancas, sector Páramo Los Romeros, Parque Nacional Sierra La Culata, Mérida-Venezuela.	5
Figura 2. Caracteres morfológicos de <i>Chusquea guirigayensis</i>	6
Figura 3. Secuencia del cebador ISSR.....	13
Figura 4. Ubicación geográfica de las dos poblaciones de <i>C. guirigayensis</i>	21
Figura 5. Páramo de Piedras blancas-Páramo de los Romeros, Edo. Mérida.	21
Figura 6. Imagen satelital de las macollas muestreadas en el Páramo de Piedras Blancas, sector Páramo de Los romeros, Parque Nacional Sierra La Culata, Mérida-Venezuela.	23
Figura 7. Niveles de muestreo 2 y 3.....	23
Figura 8. Proporción de ejemplares vegetativos, en estado reproductivo y post-reproductivo muestreados para la población de <i>C. guirigayensis</i> del Edo. Mérida.....	34
Figura 9. Representación espacial de las 22 macollas de <i>C. guirigayensis</i> muestreadas en el Páramo de Piedras Blancas, indicando su estado fenológico.....	34
Figura 10. Estandarización del método de extracción de ADN.	36
Figura 11. ADN extraído por el método Cabrera-Ponce (1995).....	36
Figura 12. Productos de la amplificación del intrón <i>rpl16</i> (cebadores <i>rpl1516/rpl16-F</i>).....	37
Figura 13. Productos de amplificación del marcador M13.....	37
Figura 14. Titulación $MgCl_2$	38
Figura 15. Amplificados del intrón <i>rpl16</i> utilizando la combinación de cebadores <i>rpl1516/rpl16-F</i> ...39	39
Figura 16. Amplificados del intrón <i>rpl16</i> utilizando la combinación de cebadores <i>rpl1661/rpl16-F I</i> 39	39
Figura 17. Amplificados del intrón <i>rpl16</i> utilizando la combinación de cebadores <i>rpl1661/rpl16-F II</i> 40	40
Figura 18. Amplificados del intrón <i>rpl16</i> utilizando la combinación de cebadores <i>rpl1661/rpl16-F III</i> 40	40
Figura 19. Árbol filogenético a partir de la secuencia del intrón <i>rpl16</i> de <i>C. guirigayensis</i>	42

Figura 20. Dendograma para el análisis de la distancia genética entre las especies del género *Chusquea* y los controles positivos empleados en el estudio. 44

Figura 21. Dendograma para los tres niveles de muestreo basado en las distancias de Nei (Nei 1973).. 51

Figura 22. Distribución física de las 33 muestras colectadas en la población de *C. guirigayensis* identificando los ramets y gentes 52

Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de algunos estudios con marcadores moleculares utilizados en estudios poblacionales en bambúes leñosos. 18

Tabla 2. Marcadores moleculares amplificados por PCR (ISSR y *rpl16*)..... 25

Tabla 3. Reacción para los cebadores del intrón *rpl16*..... 26

Tabla 4. Reacción para los marcadores ISSRs 26

Tabla 5. Estado reproductivo, altura y georreferenciación de los individuos muestreados en la población de *C. guirigayensis* del Edo. Mérida. 35

Tabla 6. Resultados de la amplificación del intrón *rpl16* con ambas combinaciones de cebadores. 40

Tabla 7. Secuencia del intrón *rpl16* de *Chusquea guirigayensis* amplificado con la combinación de cebadores *rpl1516/rpl16-F*. 41

Tabla 8. Características de las bandas producto de la amplificación de los marcadores ISSRs empleados para evaluar su capacidad de detección de polimorfismos inter-específicos entre las especies del género *Chusquea*. 43

Tabla 9. Características de las bandas producto de la amplificación de los marcadores ISSRs empleados para el estudio de la diversidad genética de *C. guirigayensis*. 45

Tabla 10. Índices y parámetros de diversidad genética obtenidos con los marcadores ISSRs para *C. guirigayensis* en todos los niveles de estudio.. 48

Tabla 11. Comparación de los índices de diversidad de *C. guirigayensis* con otros estudios de bambúes leñosos en sus ambientes naturales obtenidos con estudios de marcadores ISSR. 61

1 Introducción

1.1 Características de los Bambúes

Los bambúes se distribuyen naturalmente en todos los continentes a excepción de Europa y la Antártida; por lo que forman parte importante de la cultura de muchos países de Asia, América y África, principalmente por su valor ornamental y utilitario dada la versatilidad de usos y el aprovechamiento integral de la planta. Las hojas se utilizan para forraje, los brotes para el consumo humano, sus culmos sirven para la construcción, elaboración de muebles, artesanías y enseres del hogar, la producción de fibras textiles y la elaboración de instrumentos musicales (Canavan 2016). El bambú, al igual que el arroz, el maíz, el trigo y la caña de azúcar, se encuentra ligado al sustento humano, razón por la cual se le conoce como "la planta de los mil usos" (Clark *et al.* 2015; Judziewicz *et al.* 1999).

Se ha estimado que cerca de 2,5 billones de personas en el mundo están directamente vinculadas con la producción y el consumo de los bambúes, ya que brindan numerosos beneficios económicos y ambientales. En Suramérica, específicamente en Brasil, Colombia y Ecuador, se emplea como sustituto de la madera por sus excelentes propiedades físico-mecánicas derivadas de la elevada proporción de fibras lignificadas en los culmos (Canavan *et al.* 2016; Judziewicz *et al.* 1999). Además, gracias a su rápido crecimiento, característico de las gramíneas, los bambúes constituyen excelentes candidatos para mitigar los efectos adjudicados al cambio climático global, sirviendo como especies pioneras en los espacios de restauración ecológica (Wysocki *et al.* 2015).

Los bambúes pertenecen a la subfamilia Bambusoideae, una de las 12 subfamilias actualmente reconocidas dentro de las Poaceae (gramíneas). Éstos a lo largo de toda su vida se propagan continuamente mediante sus tallos subterráneos (rizomas); al igual que las gramíneas, son organismos clonales donde el organismo con un genotipo propio se denomina "genet" y el mismo está constituido por numerosos culmos llamados "ramets", que en su conjunto forman la macolla. Cada conjunto de culmos o "ramets" posee el mismo genotipo que el "genet" que lo originó (Judziewicz *et al.* 1999). La distribución de los clones en las poblaciones de bambúes se puede observar en parches, debido a la muerte de los "ramets" ubicados hacia el centro del agrupamiento (macolla), de modo que la población se convierte en un conjunto de ramets con la misma genética pero distanciados en parches o agrupamientos diferentes (Insuasty 2014).

Dentro de la subfamilia Bambusoideae, los bambúes herbáceos (Olyreae) se pueden distinguir fácilmente por su tamaño reducido, hojas pseudopecioladas bien diferenciadas, con lígulas externas e

internas (contralígulas); culmos escasamente lignificados, ramas vegetativas de desarrollo limitado, espiguillas unisexuales y floración anual o bianual. Los bambúes leñosos (Arundinarieae y Bambuseae) comparten con los herbáceos las hojas pseudopecioladas, con lígula externa e interna; sin embargo, se diferencian mucho en cuanto al tamaño, el cual puede variar entre 0,5 m y 30 m, sus sistemas de rizomas complejos y muy desarrollados, culmos altamente lignificados, entrenudos generalmente huecos y ramificados, espiguillas bisexuales y floración típicamente monocárpica, siguiendo patrones fenológicos variados (Clark *et al.* 2015 ; Judziewicz *et al.* 1999).

El cuerpo de un bambú se separa en una porción subterránea y una aérea. La estructura subterránea está formada por una red de raíces fibrosas adventicias y los rizomas o tallos subterráneos (Judziewicz *et al.* 1999). La porción aérea está constituida por tallos articulados denominados culmos. Los nudos portan las yemas que nacen de éstos y dan origen a ramas y complementos de ramas; estos últimos portan los nomófilos y sinflorescencias. Los culmos articulados se dividen en nudos y entrenudos, estos últimos pueden ser huecos (condición más frecuente) o sólidos. En los nudos se desarrollan las yemas que originan complementos de ramas, hojas y estructuras reproductivas. El número, tamaño, forma y disposición de las yemas aportan información taxonómica para la delimitación de grupos en la familia Bambusoideae.

Durante su desarrollo, las yemas se encuentran protegidas por brácteas, conocidas como hojas caulinares, ubicadas alrededor de los entrenudos, pudiendo ser caducas o persistentes. Los complementos de rama portan las hojas propiamente dichas o nomófilos (Judziewicz *et al.* 1999). Tanto las hojas caulinares como los nomófilos se dividen a su vez en una porción basal envolvente, denominada vaina, seguida de una porción expandida, conocida como lámina. En el sitio de unión de la vaina se encuentra la lígula seguida de una constricción que forma el pseudopecíolo, característico de la subfamilia Bambusoideae. La lígula puede tener una consistencia membranácea o pilosa. Los bambúes se diferencian del resto de las gramíneas por poseer una lígula interna y una externa (Judziewicz *et al.* 1999). Para la identificación taxonómica de los bambúes, cuando no se dispone de estructuras reproductivas (sinflorescencias), se utilizan los órganos vegetativos mencionados anteriormente (Ely 2009).

1.2 Clasificación, distribución y delimitación del género *Chusquea*

A partir del siglo XX aumentó significativamente el número de estudios en bambúes, especialmente en el área de la taxonomía y la filogenia, éstos han contribuido en gran medida a una mejor comprensión de la diversidad y evolución del bambú, concretándose en el Grupo de Filogenia de Gramíneas (GPWG) en el año 2001. Los datos de las secuencias moleculares obtenidas por este grupo

(GPWG) sirvieron para conformar la base del sistema de clasificación filogenética más completo de bambúes (BPG, 2012) (Clark *et al.* 2015). Estos estudios apoyaron de manera contundente la noción de los bambúes como un linaje distinto de la familia Poaceae, ubicándolos en el clado BEP (Bambusoideae, Ehrhartoideae, Pooideae) con una relación de grupos hermanos entre Bambusoideae y Pooideae, pese a que aún no se han encontrado las sinapomorfías morfológicas comunes.

Los estudios moleculares separan a la subfamilia Bambusoideae en tres tribus de carácter monofilético: Arundinarieae (bambúes leñosos de climas templados con 581 especies en 31 géneros), Bambuseae (bambúes leñosos tropicales, con 966 especies en 73 géneros) y Olyreae (bambúes herbáceos con 123 especies, en 21 géneros) (Soreng *et al.* 2017; Wysocki *et al.* 2015).

La subfamilia Bambusoideae comprende 125 géneros y aproximadamente 1670 especies; de las cuales, 64% son nativas del sudeste de Asia, 33% crece en América Latina y el resto entre África y Oceanía. En Sudamérica existen un total de 90 géneros y 812 especies, que se distribuyen desde los 51° de latitud norte, desde México, hasta los 47° de latitud sur, en Chile y desde el nivel del mar hasta los 4300 metros de altitud, con representantes desde los páramos de los Andes tropicales hasta la selva tropical y subtropical (Londoño 1990; Soreng *et al.* 2017; Wysocki *et al.* 2015).

Venezuela ocupa el tercer lugar en Sudamérica en lo que respecta a la diversidad de bambúes, con 10 géneros, aproximadamente 62 especies leñosas y 8 géneros con 21 especies herbáceas (Ely y Clark 2011). En el clado Bambuseae encontramos a la subtribu Chusqueinae, representada por un único género, el género *Chusquea* Kunth. Este género destaca entre los bambúes americanos como el más rico en especies y el que presenta el intervalo de distribución más amplio dentro del grupo, tanto desde el punto de vista geográfico como altitudinal.

El género *Chusquea* se extiende desde México hasta Argentina y Chile, con representantes desde los 1500 hasta los 4300 m snm (Fisher *et al.* 2009; Fisher *et al.* 2014, Clark *et al.* 2015). Las especies de Chusqueinae son características de los bosques montanos de México, América Central, América del Sur y el Caribe, con un importante número de representantes en bosques nublados, bosques tropicales, bosques Atlánticos, páramos, tepuyes y campos de altitud en Brasil (Fisher *et al.* 2009).

El género *Chusquea* abarca cinco subgéneros: *Chusquea* subg. *Chusquea* Kunth, *Chusquea* subg. *Swallichloa* McClure, *Chusquea* subg. *Rettbergia* Raddi, *Chusquea* subg. *Platonina* Fisher y *Chusquea* subg. *Magnifoliae* Clark (Fisher *et al.* 2014). La Monofilia de *Rettbergia* se encuentra bien sustentada por análisis de secuencias genéticas cloroplastídicas y dos sinapomorfías morfológicas; mientras que la monofilia del clado *Euchusquea* (subg. *Chusquea* y subg. *Swallichloa*) es apoyada únicamente por datos de secuencias de genes plastídicos. Los subgéneros *Platonina* y *Magnifoliae* se

añadieron recientemente dentro del género como linajes que divergieron tempranamente en el grupo y se ubicaron dentro del género *Chusquea* basados principalmente en el soporte molecular y algunas sinapomorfías morfológicas potenciales, ya que no se observan caracteres morfológicos marcados que vinculen estas especies de manera clara respecto a las características morfológicas distintivas del grupo (Fisher *et al.* 2014; Fisher *et al.* 2009). El tipo de rizoma está muy ligado a los diferentes grupos de bambusoideae: las especies del género *Chusquea* pertenecientes al subgénero *Chusquea* pueden presentar rizomas anfimorfos, leptomorfos o paquimorfos, mientras que las especies pertenecientes al subgénero *Swallemochloa* poseen rizomas exclusivamente paquimorfos (Clark 1986; Ely 2009; Judziewicz *et al.* 1999).

1.3 Sistemática actual de la especie *Chusquea guirigayensis*

El género *Chusquea* en Venezuela tiene una amplia distribución en el territorio nacional, con excepción de las regiones bajas como el Litoral, los Llanos y la región del Delta del Orinoco. Este género está típicamente asociado a ecosistemas montañosos como bosques nublados, bosques preparameros y páramos (Ely y Clark 2011). De las 13 especies de *Chusquea* descritas para Venezuela, ocho están presentes en la Cordillera Andina de Mérida, de las cuales cuatro pertenecen al subgénero *Swallemochloa* y crecen en ecosistemas de páramo: *C. angustifolia* LG Clark y C. Calderón, *C. guirigayensis* Niño, LG Clark y Dorr, *C. spencei* Ernst y *C. tesellata* Munro (Ely y Clark 2011; Niño *et al.* 2006). Es importante señalar que de las cuatro especies mencionadas, *C. guirigayensis* es la que crece a mayores elevaciones en los Andes venezolanos, entre 3700-4000 m snm (Figura 1) y además es endémica del páramo altiandino en Venezuela (Ely 2011).



Figura 1. *Chusquea guirigayensis* en el Municipio Rangel, Páramo de Piedras Blancas, sector Páramo Los Romeros, Parque Nacional Sierra La Culata, Mérida-Venezuela.

C. guirigayensis se caracteriza por presentar una forma de vida arbustiva, de hojas esclerófilas, con rizomas engrosados y paquimorfos. Los culmos son erguidos, de 0,3-1,2 m de alto y 0,2-0,5 cm de diámetro en la base, sólidos y fuertemente lignificados, de coloración vino tinto en culmos jóvenes, que se tornan ocre al madurar. Cada nudo porta 1-8 ramas y posee hojas caulinares persistentes (1-5 cm de largo). Las hojas del follaje son marcadamente coriáceas, reducidas entre 1-5 cm, lanceoladas, con el ápice formando un aguijón. Las sinflorescencias están constituidas por espiguillas uniflosculadas péndulas (Figura 2) (Niño *et al.* 2006).

Hasta la fecha, no se han realizado estudios poblacionales de *C. guirigayensis*; los únicos estudios efectuados en esta especie se limitan a un estudio sistemático, en el cual se describe a esta especie por primera vez, basado en una única colección procedente de la localidad del Monumento Natural Guirigay-Teta de Niquitao, en el estado Trujillo (del cual se deriva su nombre) realizado por Niño *et al.* (2006). Posteriormente, se reportó por primera vez a la especie en el Estado Mérida, específicamente en el Páramo de Los Romeros - Sierra de Mifafí - La Culata (Ely 2009), el cual sirvió de partida para un estudio morfoanatómico de la especie (Kiyota 2011) y un estudio ecológico enfocado a sus mecanismos de resistencia a bajas temperaturas en el páramo altiandino (Ely *et al.* 2014).

El estudio realizado por Kiyota (2011) reveló una estructura morfoanatómica foliar típicamente escleromorfa, con una elevada proporción de tejidos esclerenquimáticos asociados a los haces vasculares, producto de su adaptación a ambientes extremos de alta montaña, como los del superpáramo o páramo altiandino (3700-4000 m snm), semejante a la de muchos de los arbustos que cohabitan en el mismo ecosistema.

Por otro lado, el estudio de resistencia a bajas temperaturas indicó que *C. guirigayensis*, al igual que las otras especies del mismo subgénero (*C. angustifolia* y *C. spencei*), evade el congelamiento extracelular inducido por bajas temperaturas nocturnas gracias a un moderado sobreenfriamiento histológico (Ely *et al.* 2014).

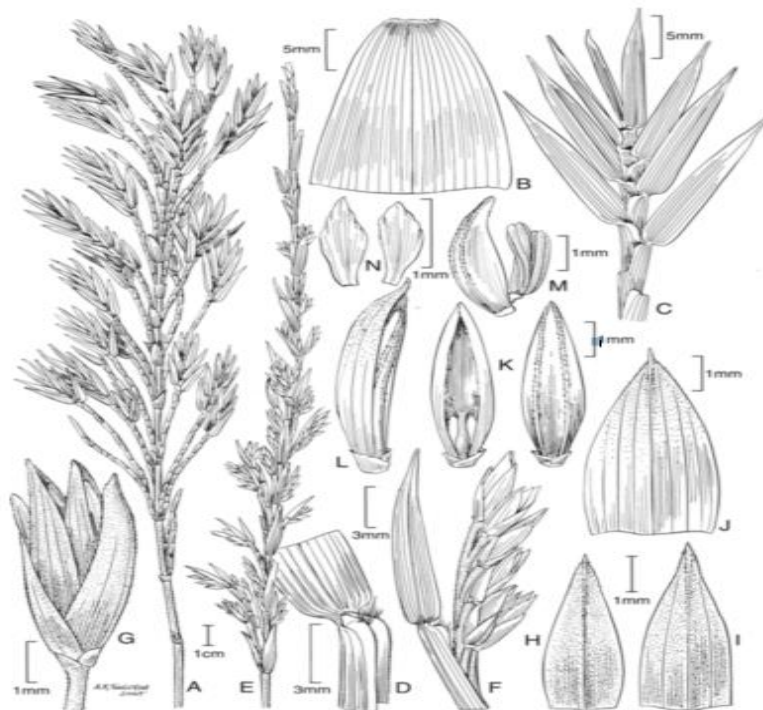


Figura 2. Caracteres morfológicos de *Chusquea guirigayensis*. **A**, Hábito y rama con hojas del follaje. **B**, Vaina de la hoja del culmo. **C**, Detalle de una rama con hojas en estado vegetativo. **D**, Área lígula. **E**, Rama fértil. **F**, Detalle de una inflorescencia. **G**, Espiguilla. **H-I**, Paleas. **J**, Lema extendida. **K-L**, Lemas, vistas lateral y frontal. **M**, Lema fértil, se aprecian estambres. **N**, Lodículas par anterior. Tomado de Niño, 2006.

La limitada distribución y extensión de esta especie de bambú sugiere que se debe prestar especial cuidado a las dos aparentemente únicas poblaciones existentes, razón por la cual se recomendó la inclusión de esta especie en el listado de especies vulnerables de la última edición del Libro Rojo de la Flora de Venezuela (Ely y Clark en prensa).

1.4 Fenología reproductiva de los bambúes del género *Chusquea*: subg. *Swallenochloa*

El ciclo de vida de los bambúes nos permite diferenciarlos fácilmente de otras subfamilias dentro de la familia Poaceae, por el hecho de que además de ser típicamente monocárpicas, permanecen en estado vegetativo durante muchos años, debido a una fase pre-reproductiva muy extendida. Sus ciclos de floración pueden ocurrir en intervalos de tiempo entre los 10-40 años y hasta 140 años para algunos bambúes leñosos, siendo estos intervalos muy variables entre especies. Se ha encontrado que los eventos de floración dentro de los miembros de la subfamilia Bambusoideae pueden ocurrir de forma gregaria (sincrónica), esporádica (asincrónica) o continua. En la floración gregaria todos los genets florecen al mismo tiempo, pudiendo extenderse la floración por varios meses hasta algunos años; la floración esporádica ocurre en intervalos irregulares y en una misma macolla alternan

“ramets” fértiles y “ramets” vegetativos. Comúnmente los intervalos de floración esporádicos son más cortos que en la floración gregaria y no necesariamente terminan con la muerte del genet en floración.

Por último, en la floración continua una misma macolla alterna “ramets” fértiles con “ramets” vegetativos (Judziewicz *et al.* 1999; Ely 2009; Ramírez-Narváez y Velasco-Linares 2016); sin embargo, su fenología reproductiva también puede variar en función de la latitud, el género y la forma de vida. El patrón de floración más común en los bambúes leñosos es el gregario, evento que puede extenderse varios años en una misma especie (Guerreiro y Agrasar 2013; Pearson *et al.* 1994; Clark *et al.* 2015). En general se ha encontrado que los bambúes americanos poseen un ciclo de floración más corto que el de los bambúes asiáticos (Judziewicz *et al.* 1999).

La reproducción sexual tardía en bambúes leñosos es compensada con la reproducción asexual continua a partir de rebrotes de los rizomas que dan origen a nuevos culmos. En el caso de las especies de *Chusquea* pertenecientes al subgénero *Swallemochloa*, exclusivos de ambientes de alta montaña, se ha observado que los ciclos de floración pueden ser mucho más cortos, y aunque son esporádicos, se les denomina patrones de floración "continuos" por el hecho de que siempre se encuentran algunos genets en flor. Un ejemplo de esto es la especie *Chusquea subtessellata* A Hitchcock, que presenta una floración que es continua en lugar de cíclica; sin embargo, en numerosas visitas de los investigadores Horn y Clark (1992) a la población de *C. subtessellata* ubicada en la Cordillera de Talamanca-Costa Rica, solo en pocas ocasiones encontraron flores con estructuras reproductivas viables (Horn y Clark 1992; Judziewicz *et al.* 1999).

Estudios recientes sugieren que el éxito de la germinación y el desarrollo de los rebrotes de los bambúes a partir de las semillas depende en gran medida de las condiciones microclimáticas del lugar donde se posicionen las semillas, además de las características adaptativas de la especie a dichas condiciones (Lin *et al.* 2018; Matsuo *et al.* 2018).

Aun cuando la posibilidad de hallar algunos genets fértiles en las poblaciones de especies del subgénero *Swallemochloa* es muy elevada, nunca se han encontrado cariósides en especímenes de herbario y tampoco se han observado en el campo (Horn y Clark 1992). En el caso de *C. subtessellata* A. Hitchcock de floración típicamente gregaria en intervalos largos (4-5 años); la ausencia de semillas viables no era atribuible a la limitada duración del polen, ya que Horn y Clark (1992) realizando pruebas de viabilidad de polen, encontraron ejemplares con una viabilidad del 89%, mientras que encontraron diferencias en la viabilidad del polen entre diferentes individuos de la población, con rangos bastante representativos, incluyendo individuos con una viabilidad del 0,5 %, 1% y otros con una viabilidad del 2,5%. Estos investigadores atribuyeron estas discrepancias a diferencias genéticas entre los genets evaluados en dicha población. Horn y Clark (1992) sugirieron hacer una comparación

de la estructura clonal de las poblaciones de bambúes de altura (Subg. *Swallenochloa*) utilizando alguna técnica de caracterización molecular como el perfil por isoenzimas, con el objeto de comparar la ausencia de semillas con la compatibilidad del polen entre las poblaciones que son fundamentalmente clonales (Horn y Clark 1992).

Una característica común en todas las especies de bambúes es la continua reproducción clonal que presentan a lo largo de sus vidas. Muchos autores han dirigido esfuerzos para determinar cuáles son los factores que contribuyen a la predominancia de la reproducción asexual sobre la reproducción sexual en las especies vegetales. Silvertown (2008) analizando 29 estudios de diferentes especies de reproducción clonal en Poaceae, incluyendo algunas especies de Bambusoideae, indicó que dicha reproducción predomina en poblaciones más longevas; en consecuencia, las perturbaciones en dichas poblaciones, bien fuesen continuas o esporádicas, favorecían la reproducción sexual en la población. El mismo autor afirma que la reproducción asexual puede tener ventajas en ciertos escenarios sobre la reproducción sexual, como en poblaciones pequeñas donde la reproducción sexual se ve reducida por la incompatibilidad entre los clones, favoreciendo la clonalidad en poblaciones de especies raras. Generalmente este tipo de poblaciones se ubican en los límites de los rangos geográficos de las especies vegetales, donde la reproducción sexual se encuentra sujeta a limitaciones fisiológicas, principalmente por la temperatura, la humedad, la escasez de nutrientes, la intensidad lumínica, entre otros factores que generan condiciones extremas para la especie, resultándole fisiológicamente más favorable la reproducción clonal (Silvertown 2008; Chen 2015; Yang, 2016).

Chusquea guirigayensis se presenta como un modelo interesante de estudio, ya que al pertenecer al subgénero *Swallenochloa* aunado a la información derivada de observaciones de campo, sugiere un patrón de floración asincrónico, que podría catalogarse de continuo, por el hecho de que en repetidas visitas realizadas a la población del Páramo de Los Romeros desde el año 2009, se ha podido verificar la existencia de un elevado número de macollas fértiles, hecho que debería favorecer una alta diversidad genética en la población. Por otro lado, la condición de rizomas de tipo paquimorfo facilita en principio, la discriminación visual entre los “genets” de una misma población.

Ely (2009) empleando marcadores de tipo ISSR, RAPD y SSR, comparó la diversidad genética en tres especies del género *Chusquea* en los Andes venezolanos; dos del subgénero *Chusquea* de bosques nublados (*Chusquea purdieana* Munro y *C. serrulata* Pilger) y una del subgénero *Swallenochloa* (*C. spencei* Ernst) del páramo, con el objeto de determinar si la distribución en hábitats particulares afectaba el grado de diversidad genética de las especies. Los resultados de dicho estudio revelaron una elevada y comparable diversidad genética en las tres especies, pese a las diferencias en su forma de vida (trepadoras vs arbustiva) y de hábito (bosques nublado vs páramo) y tipo de

reproducción (gregaria vs asincrónica/continua). La elevada diversidad de genotipos en las tres especies estudiadas sugiere que, a pesar de su propagación vegetativa continua y diferencias en la extensión de sus ciclos de floración, el cual se estima que pudiese ser de aproximadamente 35 años en el caso *C. purdieana* Munro (Clark y Ely 2013), la reproducción sexual juega un papel muy importante en este grupo.

Los modelos en los que se han empleado marcadores moleculares para el estudio del nivel de contribución de la floración en poblaciones de bambúes, hasta la fecha, solo se han realizado en especies de bambúes asiáticos, con sistemas de rizomas leptomorfos, encontrando que en algunas especies de bambúes los eventos de floración ocurren de manera asincrónica dentro de un mismo genet, lo que supone que algunos culmos pertenecientes a un mismo genet pudiesen participar en eventos de floración posteriores a la floración en masa o sincronizada dentro de la población. Kitamura y Kawahara (2009) emplearon marcadores de tipo SSR para determinar la incidencia de la floración asincrónica en genets de *Sasa cernua* Makino, tanto a nivel poblacional como en un mismo genet, aprovechando un evento de floración masivo y descubrieron que todos los ramets fértiles pertenecían al mismo clon, en el cual coexistían ramets fértiles senescentes y ramets vegetativos juveniles, hecho que les permitió concluir que los eventos de floración en *S. cernua* no necesariamente involucran la muerte del genet.

Este mismo ciclo reproductivo ha sido observado por numerosos investigadores realizando un seguimiento del periodo de floración en bambúes de la especie *Sasa pubiculmis* Makino durante 4 años. Miyazaki *et al.* (2009) utilizando técnicas moleculares de tipo AFLP, encontraron que esta especie posee rasgos reproductivos policárpicos, ya que un genet puede mantener vivos culmos en estado vegetativo conectados por su rizoma a culmos que se encuentren en estado reproductivo, participando en el evento de floración masiva de la época. Mizuki *et al.* (2014), mediante observaciones en poblaciones de bambúes del mismo género (*Sasa*), determinaron que a diferencia de lo reportado comúnmente para otros géneros de bambúes sobre los eventos de floración, los genets con culmos de floración sincrónica y asincrónica no morían después de la floración. Se desconoce si este patrón de floración pudiese presentarse en otros géneros de bambúes.

Entre los estudios sobre la floración en los bambúes americanos destaca el de Pearson *et al.* (1994) quienes estudiaron la fenología de *Chusquea culeou* Desvaux en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia-Argentina, concluyendo que la población tiene una fase pre-reproductiva o vegetativa de 54 años. Una conclusión importante de este estudio fue el descubrimiento de la complejidad en el patrón de floración de dicha especie, pues en una misma localidad observaron al menos un evento de floración gregaria sobre un área extensa y a la vez, varias floraciones esporádicas en áreas más

reducidas. En ambos casos, observaron que los eventos de floración resultaron en la muerte de los genets en floración.

Estos patrones de floración complejos concuerdan con el seguimiento realizado durante 5 años por Montti *et al.* (2011) para *Chusquea ramosissima* Lindman en la provincia antártica de Argentina, encontrando sitios de floración intercalados con sitios que no florecieron, y a su vez en pequeños parches, encontraron culmos en flor y culmos vegetativos pertenecientes a la misma macolla, patrón que no afectaba el nivel de cobertura ocupado por la especie de bambú en la zona.

También se han encontrado casos donde agrupamientos aislados de especies del género *Chusquea* pueden permanecer en estado vegetativo durante los ciclos reproductivos masivos, como el reportado por Widmer (1999), quien estudió la floración de las especies de bambú *C. talamancensis* Widmer y Clark, *C. tomentosa* Widmer y Clark y *C. subtilis* Widmer y Clark en la Cordillera de Talamanca-Costa Rica; siguiendo la floración durante dos periodos de 10 a 15 años, encontraron que las especies seguían un ciclo reproductivo monocárpico (un único ciclo reproductivo seguido de la muerte). Sin embargo, algunas plantas aisladas permanecían en estado vegetativo pudiendo llegar a florecer fuera del evento reproductivo masivo.

1.5 Citogenética y genoma de los bambúes del género *Chusquea*

Tradicionalmente, la clasificación de los bambúes se basa en caracteres morfológicos; no obstante, el número de cromosomas determinado mediante cariotipos se ha utilizado como herramienta para la clasificación de muchas especies de bambúes. El empleo de cariotipos como carácter taxonómico en especies poliploides amerita llevar a cabo procedimientos que necesitan individuos fértiles (en etapa de floración), ya que resulta muy complicado realizar el conteo exacto del número de cromosomas en células somáticas, inclusive cuando éstas se encuentren en división mitótica. En cambio, en los gametos se encuentra reducida la carga genética de los organismos a la mitad, además de encontrarse condensado el material genético en sus cromosomas. Sin embargo, en los bambúes, los especímenes en estudio pocas veces poseen estructuras reproductivas aprovechables para este fin por lo que, hasta la fecha, los estudios cariológicos en la subfamilia Bambusoideae son limitados (Wysocki *et al.* 2015; Yeasmin *et al.* 2015).

Las gramíneas son bien conocidas como un grupo con una alta incidencia de poliploidía y los bambúes no son una excepción. Los bambúes poseen comúnmente un número básico de cromosomas de 10 o 12, si son bambúes leñosos ($2n= 12$); mientras que si son bambúes herbáceos verdaderos (*Olyreae*), tienen una diversidad de número base que incluyen 7, 9, 10, 11 y 12 cromosomas, siendo los más comunes 10 y 11. La mayoría de los bambúes leñosos americanos en las 4 subtribus son

tetraploides: poseen entre 10 y 12 cromosomas, definiendo su base cromosómica como $2n=12$, con la excepción del género *Chusquea* y dos especies de *Aulonemia* Goudot que poseen un número base de $2n=10$ (Clark y Pohl, 1992). En la actualidad los recuentos de cromosomas están disponibles para menos del 10% de las especies de bambúes americanos, por lo que muchos más conteos son necesarios antes de estimar el verdadero alcance de la ploidía e inferir la tendencia evolutiva. Sin embargo, como se mencionó, los largos ciclos de floración de estas especies vegetales hacen que los estudios citogenéticos en los bambúes sean escasos (Clark *et al.* 2015; Judziewicz *et al.* 1999).

La hibridación es un evento común en las gramíneas y está relacionado con los altos niveles de poliploidía. Las posibilidades de la formación de híbridos interespecíficos en los bambúes suelen ser remotas a causa de las diferencias temporales entre los períodos de floración de las especies, en particular en especies de floración gregaria. No obstante, las posibilidades de formar híbridos se incrementan en las especies arbustivas del subgénero *Swallenochloa* como *C. angustifolia* y *C. spencei*, en las cuales se aprecian con mucha frecuencia “genets” fértiles alternando con estériles (Clark *et al.* 2015).

El genoma de la mayoría de los bambúes contiene cerca de 43,9% de contenido GC y 59,0% de elementos transponibles. Las informaciones contenidas en bases de datos en línea indican que existen aproximadamente 31987 genes codificantes para proteínas y que la longitud media del gen codificante es de 3350 pb. El número de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, acrónimo del inglés *Expressed Sequence Tags*) de las especies de bambúes depositadas en el NCBI (del inglés *National Center for Biotechnology Information*) hasta enero de 2009, es de 3087 y el número total de secuencias de nucleótidos depositadas hasta noviembre de 2009 es de 17789 (que representa tan solo el 0,1% de las secuencias totales de la familia Poaceae) (Yeasmin *et al.* 2015).

1.6 Fundamentos de la caracterización molecular con marcadores de tipo ISSR

Las técnicas de biología molecular basadas en secuenciación de ADN han facilitado la identificación de especies, ayudando a dilucidar la diversidad entre organismos consecuencia de las variaciones en las secuencias de ADN y de los efectos ambientales. La variación genética es notable: cada individuo de una especie posee una secuencia de ADN única. Las variaciones en el ADN son mutaciones resultantes de la sustitución de un solo nucleótido (polimorfismos de un solo nucleótido: SNP), inserción o delección de fragmentos de ADN de diversas longitudes (desde uno a varios miles de nucleótidos), o duplicación e inversión de fragmentos de ADN (Azofeifa-Delgado 2006; Yeasmin *et al.* 2015). La mayoría de las técnicas moleculares se basan en la extracción del ADN (genómico, nuclear, plástido y mitocondrial) para la determinación de secuencias de nucleótidos de fragmentos

específicos. Comúnmente se utiliza la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR-*Polymerase Chain Reaction*) para obtener, gracias al empleo de cebadores específicos, un mayor número de copias de la secuencia de ADN de estudio (Mullis 1990).

La técnica de PCR ha facilitado el desarrollo y selección de una gran gama de marcadores moleculares, que consisten en segmentos específicos de ADN que pueden corresponder a regiones codificantes o no codificantes en el genoma, cuya secuencia puede o no ser conocida previamente. Entre los marcadores comúnmente empleados en la caracterización genética de especies vegetales, se emplean usualmente las secuencias intergénicas repetidas simples (ISSR). Los ISSR consisten en regiones genómicas cortas, compuestas de las secuencias comunes simples repetidas intergénicas flanqueadas por los SSRs o microsatélites (Secuencias Simples Repetidas) (Zietkiewicz *et al.* 1994; Sankar y Moore 2001). La técnica emplea cebadores de microsatélites de 16 a 25 pb de longitud, de repetidos di-, tri-, tetra- o penta-nucleótidos para amplificar múltiples loci en el genoma (Figura 3). Generalmente los amplicones de estos marcadores arrojan productos entre 400 y 2000 pb (Akagi *et al.* 1996; Lai y Hsiao 1997; Yang *et al.* 2012). Donde haya un motivo SSR particular ocurriendo en hebras de ADN opuestas con bandas distintas y suficientemente cortas para ser amplificadas, se producen bandas que pueden ser visualizadas en geles de agarosa o acrilamida (Vijayan 2005; Zietkiewicz *et al.* 1994).

El análisis con ISSR es fácil de implementar ya que los cebadores se pueden obtener de la literatura existente sobre SSR en plantas, así como a partir de la información en las bases de datos de secuencias. Los cebadores no necesitan ser locus-específicos, ya que se dirigirán a cualquier región del genoma que contenga un motivo microsatélite complementario, haciendo dependiente su grado de polimorfismo de cuando un genoma carezca de la secuencia repetida o tenga una delección, inserción o translocación que modifique la distancia entre los repetidos (Culley y Wolfe 2001; Esselman *et al.* 1999; Sankar y Moore 2001). Los ISSRs se utilizan ampliamente para el análisis genético de poblaciones de plantas, generando bandas más fiables y reproducibles que los (*Random Amplified Polymorphic DNA*) RAPDs y son técnicamente más simples de utilizar y de analizar en comparación con los marcadores (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) RFLP ya que no se requiere información de secuencia previa para generar productos de amplificación de ADN (Nilkanta *et al.* 2017).

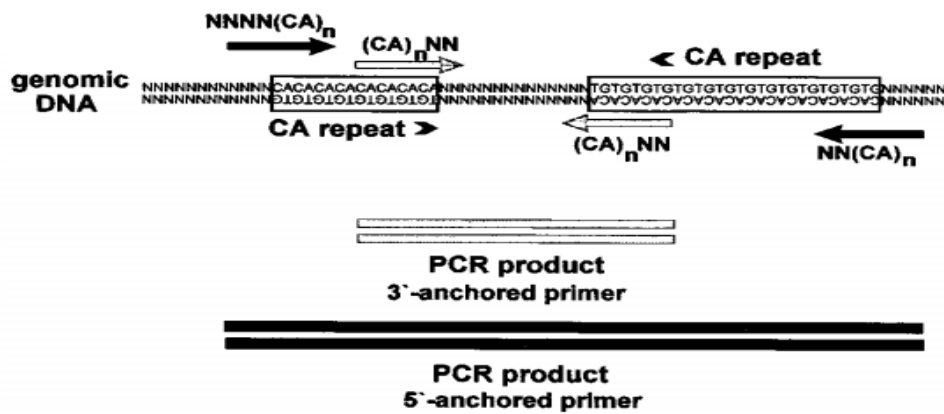


Figura 3. Secuencia del cebador único mostrando como blanco las repeticiones (CA)_n en el extremo 5' (color negro) y en el extremo 3' (color blanco). Estos cebadores son utilizados para amplificar las secuencias genómicas flanqueadas por dos elementos repetidos (CA)_n inversamente orientados. Tomado de Zietkiewicz *et al.* (1994).

Los marcadores ISSRs son considerados típicamente como dominantes; sin embargo, estos podrían, en teoría, segregarse como marcadores codominantes debido a que se derivan de secuencias de microsatélites, los cuales son codominantes (Vijayan 2005). Tomar los ISSRs como marcadores dominantes tiene sus limitaciones ya que al ser leídas las bandas no hay forma de saber si el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto; esto bajo el supuesto de que la diversidad genética está representada por cada banda y que ésta, a su vez, es tomada como un locus con dos alelos y dichos alelos están en equilibrio de Hardy-Weinberg (Eguiarte *et al.* 2007).

En especies del género *Citrus* utilizando en una población de retrocruzamiento previamente mapeada con RFLP, RAPD y marcadores isoenzimáticos; Sankar y Moore (2001) empleando cebadores de tipo ISSR detectaron co-dominancia con loci derivados de tres cebadores, ya que al realizar observaciones de los tipos de segregación de los tres marcadores ISSR confirmaron el alto nivel de heterocigosidad que se informó previamente para el padre de los retrocruces. Los ISSR empleados en este estudio mostraron principalmente segregación dominante (96,5%), mientras que solo el 13,5% mostraron segregación co-dominante (solo tres cebadores ISSR) (Sankar y Moore 2001).

En estudios de la familia Poaceae también existe evidencia de segregación codominante: el trabajo realizado por Akagi *et al.* (1996), quienes desarrollaron 76 cebadores ISSRs de secuencias dinucleotídicas repetidas con unos cebadores degenerados en el extremo 3', que cumplen la función de secuencia de anclaje, capaces de disminuir sus sitios diana permitiendo así la amplificación de bandas discretas. Como resultado reportaron que entre los fragmentos obtenidos en la mayoría de los individuos de las dos variedades de arroz estudiadas, hubo una banda derivada que fue de 329 pb para 310 de las 322 plantas utilizadas, mientras que las 12 plantas restantes tenían una banda con un peso de

345 pb, llegando a la conclusión que se trataba de la misma banda. Por lo tanto, este marcador de ADN con comportamiento codominante fue capaz de discriminar entre los dos genotipos estudiados (Akagi *et al.* 1996).

Lin *et al.* (2010) emplearon ocho marcadores ISSRs para identificar los productos de la hibridación entre dos especies de bambú del género *Phyllostachys* Siebold & Zuccarini, sugiriendo que a pesar del desconocimiento de la secuencia del genoma, pudieron distinguir claramente el producto de los cruces entre los parentales.

1.7 Marcadores moleculares en estudios sistemáticos y poblacionales de bambúes leñosos

Los estudios de sistemática molecular realizados en la subfamilia Bambusoideae se han enfocado principalmente en estudios filogenéticos basados en marcadores moleculares y secuencias de genes plastídicos, centrándose en el gen *ndhF* (codificante para la enzima NADH deshidrogenasa); en las secuencias cercanas al intrón *rpl16* y en algunas secuencias de ADN ribosomal como las ITS (región espaciadora interna transcrita del ADN ribosomal) (Clark *et al.* 2012; Kelchner y Clark 1997; Wysocki *et al.* 2015). Entre los estudios filogenéticos más recientes, se encuentra el realizado por Fisher *et al.* (2009 y 2014) quienes combinaron marcadores plastídicos y nucleares para el género *Chusquea*, con el objeto de establecer una filogenia representativa para el género y concluyeron que hasta la fecha no existen marcadores específicos que puedan resolver la filogenia en los bambúes leñosos americanos, pudiendo separar las especies en los diferentes géneros, pero sin lograr separar las especies a nivel de subgénero, obteniendo grupos parafiléticos en los niveles de subgéneros (Clark *et al.* 2015; Soreng *et al.* 2017).

Los marcadores moleculares constituyen una herramienta ampliamente utilizada en la caracterización de especies vegetales a partir de los años 90, permitiendo a los investigadores conocer la composición genética de los individuos y por ende la de las poblaciones. Entre los bambúes, los bambúes asiáticos fueron los primeros en los que se realizó análisis con marcadores moleculares desde un punto de vista poblacional. Hsiao y Riesberg (1994) estudiaron la distribución de *Yushania niitakayamensis* Hayata en un gradiente latitudinal ubicado entre Taiwán, el sur-oeste de China y el norte de Phillipinas. Estas poblaciones se analizaron con 80 cebadores del tipo RAPD, con lo cual reportaron que a pesar de lo desventajoso de la técnica por las amplificaciones al azar en el genoma, pudieron determinar que la poblaciones se reproducen de manera asexual principalmente, agrupando los individuos muestreados en solo dos genotipos diferentes. Hsiao *et al.* (1996), también estudiaron la composición genética de *Y. niitakayamensis* en tres localidades de Taiwan, empleando aloenzimas como

herramienta molecular. Evaluaron la diversidad de 180 individuos, encontrando una baja diferenciación entre las localidades muestreadas con índices de diversidad (G_{ST}) entre las subpoblaciones de 0,288; 0,270 y 0,065, correspondiendo estos valores con el alto índice de flujo génico (Nm) entre las subpoblaciones con un valor de 3,43.

Los RAPDs también se han empleado para la resolución de problemas taxonómicos, un ejemplo de ello es el trabajo de Nayak *et al.* (2003) quienes los emplearon para identificar la relación genética de 12 especies de bambúes del género *Bambusa* Schreber. Calcularon la distancia de Nei (Nei 1973) entre las especies y pudieron agrupar las que se encontraban más emparentadas, correspondiendo el resultado con lo obtenido por el estudio filogenético de Kelchner y Clark (1997). Sin embargo, la reproducibilidad de las bandas obtenidas con los marcadores de tipo RAPD ha sido ampliamente cuestionada, ya que numerosos científicos se han dedicado a comparar los RAPD con otros tipos de marcadores.

Esselman *et al.* (1999) compararon la diversidad poblacional de organismos en especies que presentan reproducción clonal continua y baja tasa de reproducción sexual como *Calamagrostis porteri* A.Gray, mediante tres métodos, a saber: aloenzimas, RAPDs e ISSRs. Con los marcadores de tipo ISSR obtuvieron más genotipos y mayor diversidad dentro de las poblaciones, con 8 genotipos diferentes entre todas las poblaciones evaluadas. A pesar del resultado, no se sabe si estos representan genets distintos generados por la reproducción sexual o si son resultado de mutaciones somáticas en las plantas adultas altamente clonales.

Entre los bambúes también se ha realizado este tipo de comparaciones. Lalhruaitluanga y Prasad (2009), compararon la diversidad genética del bambú *Melocanna baccifera* Roxb obtenida por marcadores de tipo RAPD con la obtenida por marcadores de tipo ISSR, encontrando variaciones en los resultados: para los RAPDs se obtuvo 98% de loci polimórficos, mientras que para los ISSR 84,1%, mostrando casi 14% de variación entre ambos marcadores. Los autores atribuyeron esta variación a los dos tipos de objetivos genéticos diferentes que amplifica cada marcador, que están sometidos a diferente selección en sus procesos evolutivos, afirmando que ambos marcadores resultan prometedores en el estudio de la diversidad genética poblacional de la especie.

Phyllostachys es el género en el cual se ha realizado la mayor cantidad de estudios dentro de los bambúes, tanto, que partiendo de los estudios genéticos realizados para este género se construyó una base de datos de microsatélites de bambú (<http://www.bamboogdb.org/ssr>) desarrollada para navegar y buscar información masiva de microsatélites de esta subfamilia (Zhao *et al.* 2015). No obstante, para sintetizar microsatélites es necesario conocer la secuencia de los organismos, además de que resulta laborioso la síntesis de los cebadores, por lo que la mayoría de los estudios recientes de caracterización

genética de las especies de bambúes, utilizan marcadores de tipo ISSR (Yeasmin *et al.* 2015). Lai y Hsiao (1997) estuvieron entre los primeros investigadores que utilizaron marcadores de tipo ISSR, basados en las distintas bandas polimórficas obtenidas empleando marcadores de tipo RAPD, ISSR y un VNTR, calculando mediante la distancia de Dice la distancia genética entre clones de distintas regiones, pudiendo determinar la distribución de los clones de *Phyllostachys pubescens* Mazel en distintas regiones de Taiwan.

Recientemente los marcadores ISSR han sido ampliamente utilizados en otros géneros de bambúes asiáticos como *Dendrocalamus* Stocki. En la provincia de Yuannan-China las especies de bambúes leñosos de este género tienen un alto valor económico y ecológico. Tian *et al.* (2012) estudiaron las poblaciones de *Dendrocalamus giganteus* Wall ex Munro en el sudeste Asia y la provincia Yunnan de China, empleando marcadores de tipo ISSR para evaluar la estructura genética y la diferenciación entre las poblaciones en estudio. La diversidad dentro de las poblaciones resultó bastante baja, con un 11,3% de bandas polimórficas, mientras que la diversidad entre las poblaciones fue mucho más alta, con un valor de 88,57%, esto se visualizó mejor con el índice de G_{ST} , que reportaron con un valor de 0,85; el flujo de genes (Nm) limitado es denotado con el valor bajo de $Nm = 0,09$. Este estudio se realizó en el marco del desarrollo de un programa de conservación para todas las poblaciones de la especie en cuestión.

De igual forma Yang *et al.* (2012), evaluaron la diversidad genética de 12 poblaciones naturales en Yunnan-China de *Dendrocalamus membranaceus* Yang, con el objeto de evaluar el estado de conservación de la especie en China. Para esto utilizaron 10 marcadores de tipo ISSR, generando 155 bandas de las cuales 153 resultaron polimórficas (98,71%), obteniendo una mayor diversidad genética de la especie en comparación con otras del mismo género y una menor diferenciación genética ($G_{ST} = 0.252$); también se obtuvo que una gran proporción de la variación genética estaba de manera intrapoblacional.

En India las especies del género *Dendrocalamus* también tienen importancia ecológica y económica. Annapurna *et al.* (2015) estudiaron la diversidad genética en 14 grupos de germoplasma conservados *ex situ* de la especie *Dendrocalamus stocksisi* Munro, empleando 10 marcadores de tipo ISSR, obteniendo un 71,26% de bandas polimórficas, y empleando el algoritmo computacional UPGMA pudieron separar las muestras en dos grupos según su valor de similaridad. Además, obtuvieron una variación en el valor del índice de Dice (GS) del 60 al 70%. Esta información es un estimador importante para futuros programas de conservación de las especies en los bancos de germoplasma mundiales (Annapurna *et al.* 2015). Los bambúes de la especie *Melocanna baccifera* Roxburgh tienen importancia económica para India; Nilkanta *et al.* (2017) estudiaron la variación

alélica de 7 poblaciones empleando marcadores de tipo ISSR. El análisis mostró niveles significativos de variación genética, el promedio del índice de Nei ($H_{e\ gen}$) fue de 0.16, mientras que el promedio del índice de diversidad de Shannon (I) fue de 0,25, estos valores se obtuvieron con un porcentaje de bandas polimórficas (PPB) de 59,18%; la diferenciación genética entre las poblaciones (G_{st}) fue del 0,19, obteniendo mayor variación genética dentro de las poblaciones con un 0,80.

Los estudios poblacionales empleando herramientas moleculares en bambúes leñosos americanos no son tan numerosos como para las especies de bambúes asiáticos; sin embargo, se han realizado algunos reportes importantes. Entre estos estudios se encuentra el realizado por Rugeles-Silva *et al.* (2012) quienes estudiaron la diversidad genética de nueve materiales de *Guadua angustifolia* Kunth utilizando marcadores moleculares de tipo RAMs (ISSR), obteniendo una alta diversidad genética de los materiales evaluados, reflejándose esta diversidad por un valor de heterocigocidad esperada (H_e) de 0,31 y porcentaje de loci polimórficos de 81%.

En Venezuela existen hasta la fecha solo dos estudios que involucran herramientas moleculares en bambúes leñosos nativos; el primero lo realizó Ely (2009) en el marco de su tesis de doctorado, quien estudió la diversidad genética de las 3 especies de bambúes leñosos con distribución más amplia en la cordillera del estado Mérida (*Chusquea multiramea* LG Clark & Ely, *C. serrulata* Pilger y *C. spencei* Munro), demostrando una alta transferibilidad de los marcadores ISSR, RAPD y SSR empleados en géneros de bambúes asiáticos de especies del género *Chusquea*. Con este estudio pudo estimar que todas las muestras estudiadas eran haplotipos diferentes, determinando que la especie más diversa de las tres fue *C. multiramea*, con un valor de loci polimórficos (Lp) de entre 0,98-1, un índice de diversidad de Shannon (I) de 0,6 y un valor de G_{ST} de 0,61; indicando una diversidad entre poblaciones mucho mayor que dentro de las poblaciones, apoyado por un bajo flujo genético ($Nm = 0,33$) entre las poblaciones.

En un estudio más reciente, Fernández (2016) en el marco de su tesis de licenciatura, evaluó la variabilidad genética en *Chusquea fendleri* Kunth, utilizando 7 marcadores de tipo SSR desarrollados para *Guadua angustifolia* por Pérez-Galindo *et al.* (2009), comprobando la transferibilidad la mayoría de los marcadores y obteniendo un 66% de loci polimórficos. En su estudio obtuvo valores muy bajos para los índices de diversidad ($H_{e\ gen} = 0,11$); sin embargo, utilizando el coeficiente de Dice, logró separar de manera clara las poblaciones de las especies colectadas en diferentes regiones del país. Basado en la diferenciación genética y las características morfo-anatómicas estudiadas, este estudio sugirió la separación de *C. fendleri* en dos subespecies.

En la siguiente tabla se muestra información adicional sobre otros estudios empleando marcadores moleculares en especies de bambúes leñosos.

Tabla 1. Resumen de algunos estudios con marcadores moleculares utilizados en estudios poblacionales en bambúes leñosos.

AUTOR(ES)	ESPECIE	MARCADOR	ÍNDICES	PROPÓSITO
(Suyama <i>et al.</i> 2000)	51 muestras de <i>Sasa senanesis</i>	AFLP	Similitud de Jaccard, Mantel test. Diversidad genética (G_{st})	Identificación de los distintos clones y la distancia espacial entre ellos
(Isagi <i>et al.</i> 1996)	<i>Phyllostachys pubescens</i> , 19 culmos en flor y 22 vegetativos	AFLP	Distribución espacial, genotipo de cada individuo	Identificó los clones de la población que estaban en flor
(Pérez-Galindo <i>et al.</i> 2009)	Síntesis de 24 marcadores para <i>Guadua angustifolia</i>	SSR	Heterocigosidad observada por locus varió de 0,27 a 1,00	Desarrollo de herramientas moleculares para la especie
(Kitamura y Kawahara, 2009)	<i>Sasa cernua</i> : hojas de culmos en flor/ hojas de culmos vegetativos	SSR	Diferentes genotipos en cinco loci ($H^{\circ}N$)	Identificó los clones de la población que estaban en flor
(Lin <i>et al.</i> 2010)	Híbridos entre especies del género <i>Phyllostachys</i>	ISSR	Coefficiente de Dice, similitud genética (G_s)	Identificar la distancia genética entre parentales y progenie
(Attigala <i>et al.</i> 2015)	6 poblaciones de <i>Kuruna debilis</i>	Marcadores cloroplastídicos	Coefficiente de fijación alélica (F_{st}) diferencia de las poblaciones STRUCTURE, Neighbor-Joining	Diversidad genética poblacional
(Amom <i>et al.</i> 2018)	15 especies diferentes de los géneros <i>Sasa</i> y <i>Dendrocalamus</i>	ISSR	Diversidad de Nei ($H_{e\ gen}$)	Variación filogenética genética de 15 bambúes

En vista de todos los estudios anteriormente mencionados, se demuestra cómo los marcadores moleculares sirven para realizar caracterizaciones genéticas de las especies. En muchos de ellos se emplean los marcadores de tipo ISSR, mostrando una buena transferibilidad entre las especies de bambúes asiáticos a las especies de bambúes americanos, una alta reproducibilidad y una buena detección de polimorfismos, presumimos que servirán para explorar la variabilidad genética de *C. guirigayensis*, y permitirá conocer la estructura genética poblacional de dicha especie. Esperamos que los resultados del presente estudio representen un aporte al relativamente limitado conocimiento sobre la reproducción sexual en poblaciones de bambúes americanos de alta montaña. Asimismo, esperamos que esta información obtenida ayude a impulsar el desarrollo de más programas de investigación en bambúes andinos tropicales, particularmente en el caso de especies endémicas como *C. guirigayensis*.

2 Hipótesis

Registros de herbario y repetidas observaciones de campo sugieren que *Chusquea guirigayensis* presenta un ciclo de floración continua, lo cual debería favorecer una alta diversidad alélica en la población de los Romeros-Sector Piedras Blancas - Mifafí (Edo. Mérida). Por otro lado, si los marcadores ISSR son una herramienta apropiada para la discriminación inter-genérica e inter-específica, *C. guirigayensis* debe poseer un perfil alélico único para marcadores ISSR, que difiera del perfil alélico de otras especies del subgénero *Swallenochloa* y de otras especies del mismo género.

3 Objetivos

3.1 Objetivo General

Explorar la variabilidad genética entre genets y ramets de *C. guirigayensis* en la población ubicada en la localidad del Páramo los Romeros- Piedras Blancas - Mifafi.

3.2 Objetivos Específicos

- Estimar la incidencia de la reproducción sexual en la variabilidad genética poblacional en la localidad del páramo de Los Romeros-Sector Piedras Blancas (Mérida); determinando la proporción de genets fértiles vs vegetativos en una muestra representativa de la población.
- Comparar secuencias de amplificadas de ADN de *Chusquea guirigayensis*, utilizando el marcador plasmídico *rpl16* con las secuencias del género existentes en el GenBank, con la finalidad de determinar la relación genética de esta especie con las restantes del mismo subgénero.
- Demostrar la transferibilidad de los marcadores ISSR de *Phyllostachys pubescens* Carriere, *P. kwangsiensis* Carriere, *P. bambusoides* Siebold & Zuccarini y *Dendrocalamus membranaceus* a *Chusquea guirigayensis* y a otras especies del género.
- Comprobar el nivel de discriminación de los marcadores ISSR a nivel inter- e intra-específico, y a nivel de genet, comparando perfiles de haplotipos de ramets diferentes de un mismo genet, y entre ramets fértiles y vegetativos de un mismo genet.
- Evaluar la diversidad genética intrapoblacional para *C. guirigayensis*, en función de la diversidad de haplotipos, proporción de loci polimórficos e índices de diversidad genética.

4 Justificación

La restringida distribución sumada al desconocimiento de la estructura genética poblacional de *C. guirigayensis* son razones de peso para estudiar la composición genética de la especie, en al menos una de sus poblaciones, para determinar el estado de conservación de la especie. Por otro lado, los estudios de esta naturaleza son marcadamente escasos en bambúes americanos, siendo este apenas el tercer estudio de caracterización genética poblacional en bambúes andinos del género *Chusquea* en Venezuela, y el segundo del subgénero *Swallenochloa*, solo precedido por los trabajos realizados por Ely et al. (2018) y Fernández (2016). Otra razón de peso para llevar a cabo este estudio es el limitado conocimiento relacionado con los patrones fenológicos en el género, por lo que se espera que los resultados constituyan un aporte significativo a los estudios ecológicos y de conservación en bambúes leñosos del género *Chusquea*, especialmente para los bambúes de ecosistemas andinos.

5 Metodología

5.1 Área de estudio

Los estudios realizados por Ely y Clark (2011) y Ely *et al.* (2014) reportan una distribución muy puntual para *C. guirigayensis*, restringida a dos únicas localidades ubicadas en los páramos de los estados Mérida (Páramo Piedras Blanca - sector Los Romeros, Parque Nacional Sierra La Culata) y Trujillo (Monumento Nacional Guirigay-Teta de Niquitao). Para este estudio se tomaron muestras de la población ubicada en la Cordillera Andina de Mérida, entre agosto del 2017 y enero 2018. La población se ubica específicamente en el Municipio Rangel, Páramo de Piedras Blancas-Mifafí, sector Páramo los Romeros, a una altura entre los 3799-3955 m snm, en el Parque Nacional Sierra de La Culata (Figura 4).

5.1.1 Páramo de Piedras Blancas-Páramo de los Romeros

El área de muestreo seleccionada se ubica entre 3700-4000 m snm, 08° 53' 33.1" N y 70° 57' 28,7". Ésta se caracteriza por presentar un promedio anual de precipitaciones de 800-900 mm, temperaturas mínimas absolutas de -4,97°C y máximas absolutas de 36,9°C y una media anual de 6°C (Ely *et al.* 2014) (Figura 5). Este ecosistema se caracteriza por heladas nocturnas en cualquier día del año; particularmente durante las temporadas de sequía se han registrado temperaturas congelantes frecuentes.

El páramo de Piedras Blancas representa un páramo desértico, con tres estratos de vegetación: el estrato superior dominado por rosetas arborescentes y árboles, el segundo dominado por hierbas y arbustos, y el tercero por gramíneas, siendo la familia Poaceae la segunda familia más representativa después de Asteraceae (Monasterio 1979; Ely *et al.* 2014).



Figura 4. Vista satelital de la ubicación geográfica de las dos poblaciones de *C. guirigayensis* en la Cordillera de Mérida, Páramo de Piedras Blancas- Mifafi y en el Monumento Natural Guirigay-Teta de Niquitao, en el estado Trujillo (símbolos amarillos).



Figura 5. Páramo de Piedras Blancas-Páramo de los Romeros, Edo. Mérida.

5.2 Especie de estudio

El estudio se llevó a cabo para una de las poblaciones reportadas del bambú endémico *Chusquea guirigayensis* Niño, LG Clark y Dorr, siendo la especie de bambú con distribución más limitada del ecosistema páramo. Las características morfológicas de la especie se mencionan en la sección de antecedentes.

5.2.1 Recolección del material genético de estudio

Para realizar la caracterización genética de la población el muestreo se llevó a cabo en tres niveles diferentes (Figuras 6 y 7).

(1) A nivel poblacional. Se colectaron 22 muestras foliares frescas, procedentes de los ápices de las ramas, de 22 unidades de muestreo diferentes, tomando a cada macolla como una unidad de muestreo, considerando macollas discretas, *a priori*, genets diferentes, las cuales se rotularon a saber: M1-M22. Cada macolla se seleccionó de manera aleatoria en la población, manteniendo una distancia mínima de 20 m lineales entre macollas, esto siguiendo la metodología de Ely (2009) y Fernández (2016) (Figura 6). No obstante, con frecuencia no fue fácil distinguir la unidad de muestreo por el hecho de que se apreciaron parches de genets ininterrumpidos o de distribución continua, que podían extenderse de 0,4 a 1,5 m, razón por la cual resultó casi imposible distinguir a simple vista un genet de otro.

(2) A nivel de genet (en una misma macolla). En este nivel de muestreo, se procuró colectar muestras de ramets diferentes, con una separación de al menos 50 cm entre ramets (Figura 7.1). Se tomaron un total de 11 muestras aleatorias de material foliar juvenil, procedentes de los ápices de diferentes ramets, que se identificaron con la letra R (de R1 a R11).

(3) Coexistencia de ramets fértiles senescentes y vegetativos en una misma macolla. El tercer nivel consistió en tomar una única muestra de ramets fértiles, en algunos casos senescentes y ramets infértiles (vegetativos) pertenecientes a una misma macolla (Figura 7.2), que fueron las muestras M18 y M19.

Durante todo el muestreo se tomaron datos de georreferenciación donde se encontraba cada macolla escogida al azar como unidad de muestreo. Las muestras foliares de estudio se almacenaron en bolsas plásticas con papel absorbente humedecido con agua destilada y se refrigeraron hasta su utilización, con el fin de evitar comprometer el proceso de extracción de ADN por descomposición de la muestra. Adicionalmente, se midió el tamaño de los culmos en cada individuo y se documentó la cantidad de

individuos en floración con el objetivo de comparar la relación de individuos fértiles vs vegetativos en la población.

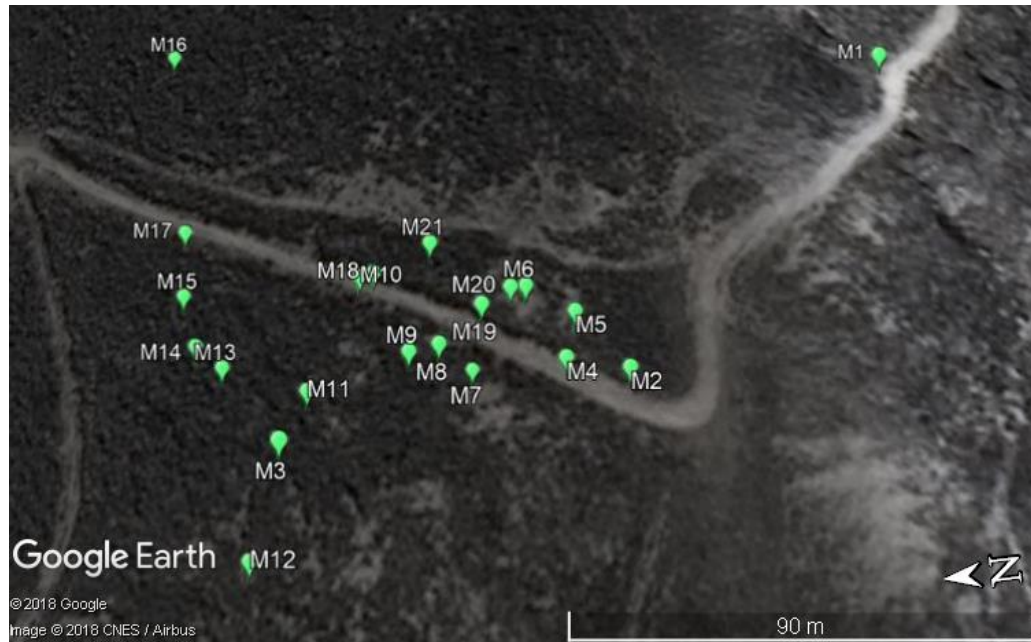


Figura 6. Imagen satelital tomada del software en línea Google Earth (Google Inc.) en la cual se indican las 21 macollas muestreadas georreferenciadas.



Figura 7. Niveles de muestreo 2 y 3. (7.1) Muestreo a nivel de genotipo en una misma macolla. (7.2) Muestreo para la evaluación de la coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla.

5.3 Análisis Molecular

5.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó siguiendo la metodología modificada de Cabrera-Ponce *et al.* (1995). Se utilizaron aproximadamente 200 mg de tejido foliar joven, a los que se adicionaron 400µl de un buffer de lisis (Urea 7M; NaCl 0.35M; Tris-HCl 0,05M pH 8.0; EDTA 0,02M y Sarcosina 1%), para luego triturar el tejido con un micropistilo. El homogenato resultante se trasvasó a un recipiente limpio y se agregaron 400µl de cloroformo (CHCl₃), solución que posteriormente fue centrifugada a 9,300 g por 10min y este paso se repitió 2 veces. El ADN fue precipitado al agregar 1/10 volúmenes de acetato de amonio 4.4M a pH 5.2 y un volumen igual de isopropanol; para precipitar el ADN se realizó una centrifugación similar a la descrita anteriormente. El ADN precipitado se lavó con un volumen igual de etanol (70%) que fue luego decantado. El ADN fue resuspendido entonces en 50µl de H₂O libre de nucleasas. Se procesaron y amplificaron en simultáneo muestras de ADN de las especies para las cuales fueron diseñados los cebadores utilizados en este estudio (*Phyllostachys aurea* y *Dendrocalamus asper*), cuyo ADN se empleó como control positivo en las amplificaciones por PCR.

5.3.2 Marcadores moleculares empleados en el estudio

Para comprobar la calidad del ADN extraído y además verificar que el producto de la amplificación por PCR correspondía a un gen reportado para especies del género *Chusquea*, se empleó un marcador correspondiente a una secuencia del intrón del gen *rpl16* del cloroplasto, ubicado en la posición 79,189–78,131 del genoma plastídico. El gen *rpl16* codifica para la subunidad ribosomal 16S y ha sido utilizado por diversos autores (Kelchner y Clark (1997), Ely (2009), Clark *et al.* (2015) y Fernández (2016)) para estudios filogenéticos en la subfamilia Bambusoideae, incluyendo especies del género *Chusquea*.

Actualmente no existen reportes de microsatélites (SSR), ni de secuencias repetidas intersimples (ISSR) específicos para el género *Chusquea*, por lo que en este estudio se emplearon: 5 marcadores ISSR utilizados con éxito por Lin *et al.* (2010) para la especie *Phyllostachys kwangsiensis* Carrière; 4 de los ISSRs empleados por Yang *et al.* (2012) para la especie *Dendrocalamus membranaceus* y 3 de los marcadores empleados por Lai y Hsiao (1997) para especies del género *Phyllostachys*, cuya transferibilidad fue demostrada para tres especies del género *Chusquea* por Ely (2009). En la siguiente tabla se muestran los marcadores con sus respectivos cebadores.

Tabla 2. Marcadores moleculares amplificados por PCR (ISSR y *rpl16*)

NOMBRE	SECUENCIA	ESPECIE DE ORIGEN DE LOS CEBADORES	KB	REFERENCIAS
UBC810	5'- (GA) ₈ T -3'	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>	0,1	(Yang <i>et al.</i> 2012)
UBC853	5'- (TC) ₈ RT -3'	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>	0.1	(Yang <i>et al.</i> 2012)
UBC864	5'- (ATG) ₆ -3'	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>	0,1	(Yang <i>et al.</i> 2012)
UBC873	5'- (GACA) ₄ -3'	<i>Dendrocalamus membranaceus</i>	0,1	(Yang <i>et al.</i> 2012)
ISSR-1	5'- (CAC) ₅ -3'	<i>Phyllostachys pubescens</i>	0,47-1,4	(Lai y Hsiao 1997; Ely 2009)
ISSR-2	5'- (CAG) ₅ -3'	<i>Phyllostachys pubescens</i>	0,5-1,02	(Lai y Hsiao 1997; Ely 2009)
ISSR-3	5'- (AC) ₈ TT -3'	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i> y <i>P. bambusoides</i>	0,5-1,02	(Lin <i>et al.</i> 2010)
ISSR-23	5'- (AC) ₈ TA -3'	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i> y <i>P. bambusoides</i>	0,5-1,02	(Lin <i>et al.</i> 2010)
ISSR-33	5'- (AG) ₈ AT -3'	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i> y <i>P. bambusoides</i>	0,5-1,02	(Lin <i>et al.</i> 2010)
ISSR-35	5'- (AG) ₈ TA -3'	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i> y <i>P. bambusoides</i>	0,5-1,02	(Lin <i>et al.</i> 2010)
ISSR-74	5'- (ACTG) ₄ -3'	<i>Phyllostachys kwangsiensis</i> y <i>P. bambusoides</i>	0,5-1,02	(Lin <i>et al.</i> 2010)
M13 (Intersatelite)	5'- (GAGGGTGGNGGNTCT) -3'	<i>Phyllostachys pubescens</i>	0,3-0,55	(Lai y Hsiao 1997; Ely 2009)
<i>rpl16-F</i> (Forward)	5'-GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG-3'	Empleado en estudios filogenéticos de bambúes leñosos (<i>Chusquea</i>)	1	(Kelchner y Clark 1997; Ely 2009)
<i>rpl16</i> (Reverse)	5'-CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG-3'	Empleado en estudios filogenéticos de bambúes leñosos (<i>Chusquea</i>)	1,1	(Kelchner y Clark 1997; Ely 2009)
<i>rpl661</i> (Reverse)	5'-CGTACCCATATTTTTCCACCACGAAC-3'	Empleado en estudios filogenéticos de bambúes leñosos (<i>Chusquea</i>)	1,4	(Kelchner y Clark 1997; Ely 2009)

5.3.3 Amplificación por Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biodiversidad y Variabilidad Molecular del Instituto Jardín Botánico de Mérida. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Thermal Cycler, modelo 2720 (Applied Biosystems). Para las reacciones se modificó la concentración de iones de Mg⁺², realizando un ensayo de titulación en reacciones de PCR, con el fin de obtener productos de amplificación más claros y nitidos (Figura 7). En el ensayo se varió la concentración de MgCl₂ entre 1,5-3,5mM. Se seleccionó la concentración con la cual fueron obtenidas las bandas más claras y nitidas: 3mM de MgCl₂. Las mezclas de reacción utilizadas para las amplificaciones por PCR se resumen en las tablas 3 y 4.

Tabla 3. Reacción para los cebadores del intrón *rpl16*

Reactivo	Volumen (µl)
GoTaq Green 2X	5
MgCl ₂ (25 mM)	1,20
Cebador Sentido (1µM)	0,1
Cebador Anti-sentido (1µM)	0,1
Suspensión de ADN (10ng /µl)	0,25
H ₂ O SPC (Suficiente para completar)	3,35
Volumen final	10

Los perfiles de temperaturas en las distintas fases del PCR se establecieron de acuerdo con el protocolo utilizado por Kelchner y Clark (1997), modificado a 35 ciclos, y un tiempo de anillamiento de 2 minutos, como los empleados por Ely (2009). Las reacciones para las amplificaciones con los marcadores ISSRs descritos anteriormente, estuvieron compuestas como sigue:

Tabla 4. Reacción para los marcadores ISSRs

Reactivo	Volumen (µl)
GoTaq Green 2X	10,0
Cebador ISSR (2µM)	0,2
MgCl ₂ (25 mM)	1,20
Suspensión de ADN (10ng/ µl)	0,25
H ₂ O SPC (suficiente para completar)	3,35
Volumen Final	10,0

5.3.4 Programas de PCR

Se emplearon tres programas diferentes, extraídos de la literatura, para los tres conjuntos de marcadores contemplados en este trabajo. Los programas fueron los siguientes:

1. Para el intrón *rpl16* (*rpl1516/rpl1661*) y para los marcadores M13, ISSR-1 e ISSR-2 se utilizó el programa propuesto por Kelchner y Clark (1997), modificado por Ely (2009), el cual tiene una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 2min; seguido por 35 ciclos de 94 °C durante 20seg; con una temperatura de anillamiento de 50 °C; la extensión a 72 °C por 2 min y un tiempo de extensión final de 2min.
2. Para los marcadores UBC-810, UBC-853, UBC-864 y UBC-873, se utilizó el programa sugerido por Yang *et al.* (2012), consistiendo en una temperatura de desnaturalización inicial de

95 °C por 5min; seguido por 35 ciclos a 95 °C durante 30seg; una temperatura de anillamiento de 50 °C; la extensión a 72 °C por 2min, y el tiempo de extensión final de 10min.

3. En las reacciones para los marcadores ISSR-3, ISSR-23, ISSR-33 e ISSR-35, se utilizó el programa empleado por Lin *et al.* (2010), que consiste en una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C por 3min; seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 45seg; una temperatura de anillamiento entre 50-55 °C; la extensión a 72 °C por 90seg, y el tiempo de extensión final de 7min.

5.3.5 Visualización de los productos de PCR

Los productos de la amplificación del intrón *rpl16* fueron visualizados en geles de agarosa al 0,8%, realizando una corrida electroforética con buffer TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA 0,04M) durante 10 minutos. Los productos de amplificación de los diferentes marcadores ISSRs, se corrieron en geles de agarosa al 2,5% durante 45 minutos aproximadamente empleando el mismo buffer. Se utilizaron dos marcadores de peso molecular de ADN (PROMEGA): uno de 1,0 Kb (G2101) para los geles con los amplificados de PCR del intrón *rpl16*, y el otro de 100 bp (G5711) para los geles con los amplificados de los marcadores ISSRs.

Los geles se visualizaron en un trans-iluminador de luz UV-visible (modelo White/Ultraviolet, UVP) gracias a la tinción con bromuro de etidio (EtBr 0,1M) y se fotografiaron con una cámara digital Olympus, modelo 810UZ. El tamaño, patrón y número de bandas obtenidas en cada caso fue determinado empleando el Software GelAnalyzer 2010.

5.3.6 Análisis de la secuencia del intrón *rpl16* de *C. guirigayensis*

Con el fin de secuenciar los productos obtenidos por amplificación del intrón *rpl16*, se seleccionaron tres de los individuos que presentaron mayor diferenciación alélica cuando se comparó el patrón de bandas obtenido con los marcadores ISSRs utilizados. El ADN de los tres individuos seleccionados fue utilizado como molde en una nueva reacción de PCR para amplificar el intrón *rpl16*, empleando un mayor volumen de reacción (50µl) (Tabla 3).

El éxito de la amplificación fue verificado mediante una corrida electroforética empleando 10µl del producto de la reacción. Los 40µl restantes se precipitaron empleando un volumen de etanol absoluto (100%) y 1/10 volúmenes de acetato de amonio (C₂H₇NO₂), que luego fue centrifugado durante 10min a 9,3g. Este paso se repitió dos veces, pero al centrifugar la segunda vez se hizo 5min y se dejó reposar durante toda la noche. Luego se agregaron dos volúmenes de etanol al 70% y la mezcla

se sometió a una nueva centrifugación durante 5 min a 9,3 g. El etanol fue decantado y los sedimentos se dejaron secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 30min. Finalmente, estos sedimentos fueron resuspendidos en 11µl de H₂O libre de nucleasas y la presencia del ADN fue comprobada realizando una corrida electroforética cargando 1µl de dicha resuspensión en un gel de agarosa al 0,8%. Los 10µl restantes fueron fraccionados en 2 porciones de 5µl cada una, con el objeto de enviar a secuenciar el producto de amplificación tanto en dirección 3' como 5' (MacroGen).

Los cromatogramas y las secuencias del intrón *rpl16* (5' y 3') enviadas por la empresa MacroGen fueron analizados empleando el programa BioEdit (Hall 1999). Las secuencias obtenidas a partir del análisis para los sentidos 5' y 3', se utilizaron para construir una secuencia "contig" para cada una de las muestras. Con el conjunto de las secuencias "contig" de los tres individuos secuenciados, se construyó una secuencia "contig" general para el intrón *rpl16*.

Esta secuencia general se empleó para realizar un alineamiento básico local de secuencias, con la herramienta BLAST (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), con el propósito de comprobar el grado de similitud de la especie *C. guirigayensis* en relación con las demás especies del subgénero *Swallenochloa* y del género *Chusquea*. Además, la secuencia del intrón *rpl16* de *C. guirigayensis* se envió al GenBank del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Voucher, aún no se posee el número de acceso).

Con la finalidad de comprobar la identidad y analizar el nivel de parentesco entre *C. guirigayensis* y las demás especies del género *Chusquea* y del subgénero *Swallenochloa*, utilizamos la secuencia del intrón *rpl16* para descargar todas secuencias depositadas en el GenBank para el género *Chusquea*, y como controles positivos las demás de la subfamilia Bambusoideae. Al alinear las secuencias descargadas del GenBank con la secuencia de *C. guirigayensis*, fue necesario reducir el tamaño de las mismas a un tamaño de 526 pb, con el fin de poder compararlas con la secuencia obtenida por nosotros. Una vez alineadas las secuencias, se empleó el programa MEGA 7 para explorar cual sería el mejor modelo para explicar las relaciones genéticas de esas secuencias, dando como resultado el modelo de HKY (*Hasegawa, Kishino y Yano*), y con el mismo programa se construyó un árbol filogenético.

Los programas utilizados para el análisis de secuencias y construcción de los árboles filogenéticos fueron los siguientes:

- **BioEdit:** Es un programa bioinformático con un interfaz fácil de usar para la edición y análisis de secuencias (Hall 1999).

- **MEGA 7:** Es un programa informático para realizar análisis estadísticos de evolución molecular y construir árboles filogenéticos, empleando diferentes algoritmos bioinformáticos (Kumar *et al.* 2016).
- **PAUP4:** Busca los métodos de parsimonia para árboles de longitud mínima, minimizando la cantidad de cambio evolutivo necesario para explicar los datos disponibles (Swofford 2000).

5.3.7 Análisis de las bandas obtenidas con los marcadores ISSRs amplificadas por PCR

Las fotografías de los geles se editaron para detectar con mayor facilidad las bandas producto de las amplificaciones, esto se realizó con los programas de edición de imágenes ImageJ 1.50e y Picasa 3.9.138. Las bandas de los amplificadas de los marcadores ISSRs se analizaron utilizando el programa GelAnalyzer 2010, registrando sólo las bandas claras y reproducibles, con valores de intensidad de pixeles detectados por el programa, entre 60-255 pixeles. Este programa transforma la imagen de cada carril del gel a escala de grises de 8 bits y evalúa gráficamente la intensidad de pixeles de cada banda detectada. Para el análisis en cuestión, cada banda detectada fue considerada como un alelo distinto para cada ramet e individuo evaluado.

Los programas utilizados para el análisis de las imágenes obtenidas de los geles de agarosa fueron los siguientes:

- **ImageJ 1.50e:** Programa especializado en la edición de imágenes de geles de electroforesis, permite invertir los colores de la imagen, rotar hasta enderezar las imágenes, agregar rótulos y personalizar el tamaño de las mismas (Ferreira 2012).
- **PICASA 3.9.138.150:** Posee diferentes herramientas que permiten la edición de imágenes fotográficas de cualquier tipo (Google Inc, 2008).
- **GelAnalyzer 2010:** Es un programa informático especializado para el análisis de imágenes de geles de electroforesis, basa su precisión en la sustracción del fondo y el calibrado del Rf por el investigador, ayudando a detectar de manera precisa los carriles, realizando cálculos precisos de los pesos moleculares y la medida aproximada de la cantidad de moléculas estudiadas en la corrida electroforética (Kuhn *et al.* 2018).

Los datos obtenidos a partir del programa GelAnalyzer 2010, sirvieron para construir las matrices necesarias para los archivos de entrada soportados por los programas bioinformáticos POPGEN y ARLEQUIN. Se construyeron dos tipos de matrices, binarias de presencia/ausencia (1/0) para cada marcador empleado y el otro tipo de matriz con el peso molecular (calculado por el programa), de las bandas registradas por cada individuo, para cada marcador.

5.3.8 Transferibilidad y discriminación de los marcadores ISSR a nivel inter-específico

Con el propósito de confirmar la utilidad de los marcadores ISSRs para la detección de polimorfismos inter-específicos y así utilizarlos para evaluar la diversidad genética intra-poblacional de *C. guirigayensis* con estos marcadores, se realizaron amplificaciones con 4 marcadores, a saber: M13, ISSR-2, UBC-810 y UBC-864; seleccionados por presentar, en la bibliografía, las bandas más claras, nítidas y reproducibles. Para esta prueba se amplificó también ADN de un grupo externo perteneciente a la subfamilia Panicoideae (*Digitaria* sp); de los géneros de bambúes para los cuales fueron diseñados los cebadores (controles positivos), *Phyllostachys aurea* y *Dendrocalamus asper*, y de tres especies del género *Chusquea*: *C. fendleri* (subg. *Chusquea*), *C. spencei* y *C. guirigayensis* (subg. *Swallenochloa*). Este estudio permitió no sólo verificar la transferibilidad de los marcadores ISSRs entre las especies del género *Chusquea*, sino comprobar que éstos marcadores son capaces de discriminar entre diferentes especies, evaluando las diferencias entre las especies en función de las semejanzas y diferencias en los perfiles alélicos de las especies.

5.3.9 Análisis de la diversidad genética de *C. guirigayensis*

Para estudiar la diversidad genética en todos los niveles de muestreo y entre *C. guirigayensis* y las demás especies vegetales utilizadas en este trabajo, se asumió que los marcadores ISSRs son de tipo dominante, que los loci polimórficos se heredaron de forma mendeliana y que la población se encontraba en equilibrio Hardy-Weinberg (Akagi *et al.* 1996; Ely 2009; Fernández 2016; Pluess y Stöcklin 2004; Sankar y Moore 2001).

En el análisis en que se evaluó la transferibilidad y la capacidad de los marcadores ISSRs para la detección de polimorfismos, se estimó: el número de alelos, número de alelos efectivos, índices de diversidad, número total de haplotipos en la población, número y proporción de loci polimórficos, e índice de distancia genética inter-poblacional.

Para la población de *C. guirigayensis* se analizó la diversidad genética en dos niveles:

-Diversidad genética a nivel poblacional (intra-poblacional): este análisis consistió en estimar para la población total de muestras el número de alelos, número de alelos efectivos, índices de diversidad, número total de haplotipos en la población, número y proporción de loci polimórficos, e índice de distancia genética intra-poblacional.

-Nivel de genet (una misma macolla): se estimó el número de alelos, número de alelos efectivos, índices de diversidad, número y proporción de loci polimórficos, número total de haplotipos,

(aplicado también para la diferenciación entre ramets fértiles senescentes y ramets infértiles vegetativos de la misma macolla), e índice de distancia genética intra-poblacional.

Los programas empleados para el análisis de la diversidad genética del estudio fueron los siguientes:

- **POPGEN Versión 1.31:** Es un paquete de computación para el análisis de la variación genética entre y dentro de las poblaciones naturales, se utiliza para marcadores codominantes, dominantes y rasgos cuantitativos. Está diseñado específicamente para el análisis de datos haploides y diploides. Realiza la mayoría de análisis requeridos en genética de poblaciones y campos relacionados. Por ejemplo: Frecuencia de alelos, diversidad genética, distancia genética, estadísticas de estructuras multilocus, etc. Esto se puede calcular para (1) poblaciones individuales de locus único; (2) locus único, poblaciones múltiples; (3) multilocus, poblaciones individuales y (4) multilocus, múltiples poblaciones (Yeh *et al*, 2012).

Este programa se utilizó para calcular:

- 1.- El número de **alelos promedio en cada loci (N_a)**:

$$n_a = (1/K) \sum_{i=1}^K n_i$$

donde K = n° loci, n_i = n° alelos detectados por locus.

- 2.- **El número de alelos efectivos (N_e)**:

$$n_e = 1 - \sum p_i^2$$

donde p_i = frecuencia del alelo polimórfico *i* en un locus.

- 3.- **Diversidad genética de Nei (Nei, 1973)**: conocida también como heterocigosidad esperada, que es un estimador de la diversidad genética de la población, expresada como:

$$H_{e \text{ gen}} = \sum_j^L h_j / L$$

donde *L* representa el número total de loci, *h_j* representa la diversidad del locus *j* con *i* alelos, que viene dado como $h_j = 1 - \sum_{i=0}^K x_i^2$ donde *x* = frecuencia del alelo *i* y *K* = n° de alelos.

- 4.- **Índice de diversidad de Shannon (SI)** expresado como:

$$SI = H_j' = - \sum p_i \log 2 p_i$$

donde p_i representa la frecuencia de la ausencia o presencia de una banda en un locus para todos los individuos del grupo.

5.- Estadísticos de distancia genética inter-poblacional: Para los estadísticos de distancia genética intra-poblacional se calculó el coeficiente de diversidad G_{ST} de Nei para todos los loci de múltiples individuos en poblaciones una misma especie. Este coeficiente se expresa como:

$$G_{ST} = D_{st}/H_t,$$

donde D_{st} representa la distancia genética intra-poblacional y H_t la diversidad genética del total de la población. G_{ST} también representa un coeficiente de fijación alélica, análogo al F_{st} de Wright, el otro estadístico que permite calcular H_s , que representa la diversidad genética intra-poblacional.

El programa construye dendogramas basados en las matrices de distancia genética de Ne-Li (Nei-Li 1979) calculado en función de la proporción de loci polimórficos presentes en cada población (anexos 12 y 13), utilizando el algoritmo **UPGMA**. Estos dendogramas sirvieron para visualizar la distancia genética entre los individuos de la población de *C. guirigayensis* y las demás especies del género *Chusquea*.

6.- Distancia genética de Nei-Li (1979) calculadas como:

$$SG = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$$

Donde m_{xy} es el número total de bandas compartidas entre pares de individuos, mientras que m_x y m_y son el número total de bandas presentes en una muestra. El valor de S/G desde 0,88 hasta 1 (entre 88% y 100% de las bandas son iguales) fue el criterio empleado en nuestra investigación para identificar las muestras que son ramets (clones) entre ellos.

- **ARLEQUIN Versión 3.5:** Es un programa comúnmente utilizado para realizar análisis genéticos a nivel poblacional con un conjunto de métodos básicos que integran las herramientas estadísticas. Está enfocado en extraer la mayor cantidad de información sobre las características genéticas y demográficas de una colección de muestras (Excoffier y Lischer, 2010).

1. **H_{nei} Haplotipos:** Indica las probabilidades de que un haplotipo sea diferente al seleccionar una muestra al azar de la población.

2. **H_{Tajima}** expresado como: $N-N_a$

Donde N_a es el número de alelos diferentes en los perfiles alélicos

Empleando el programa ARLEQUIN se calculó el número y frecuencia de haplotipos, que representa los genotipos correspondientes a los genets presentes de la población, para cada muestra. El conjunto de alelos presentes en cada muestra, para cada tipo de marcador, constituye el haplotipo, análogo a la huella de cada individuo. La frecuencia de haplotipos en una población también es un indicador de la extensión que ocupan los genets en dicha población, particularmente en aquellos que forman macollas continuas, donde se hace imposible distinguir un genet de otro. La diversidad de haplotipos constituye un indicador del peso que tiene la reproducción sexual/asexual en las especies. Una baja diversidad de haplotipos (cercana a 0, por ejemplo: 0,1) por población y/o especie, indica que existe un predominio de la reproducción asexual o vegetativa y en consecuencia, existe un número muy limitado de genets que ocupan grandes extensiones. Por el contrario, una elevada diversidad de haplotipos (más cercana a 1, por ejemplo: 0,6) sugiere que la reproducción sexual juega un papel más importante, por lo tanto, las macollas estarían conformadas por muchos genets de menores dimensiones (Silvertown 2008).

- **TreeGraph 2.14.0-771 beta:** Es un programa especializado en la visualización y personalización de dendogramas resultantes de los análisis poblacionales emitidos por los programas bioinformáticos comúnmente empleados (Java™).

6 Resultados

6.1 Caracterización y estado fenológico de la población de *Chusquea guirigayensis* del Páramo de Piedras Blancas

En el muestreo se realizaron recolectas de individuos en estado vegetativo entre 0,5-2 m de altura, aunque el promedio de todos los individuos estudiados fue de 1,5 m \pm 0,28 m, que se encontraban en un rango elevacional entre 3799-3955 m snm. La figura 8 representa gráficamente la proporción de individuos fértiles y vegetativos, donde 41% de los individuos muestreados se encontraba en estado vegetativo, los individuos en estado de floración representaron un 23% y aquellos en estado de post-floración representaron el 36% restante. Los individuos catalogados como en estado de “post-floración”, correspondían a macollas con culmos florales ya senescentes producto de un evento de floración pasado. La tabla 5 agrupa los datos cuantitativos de dicho muestreo.

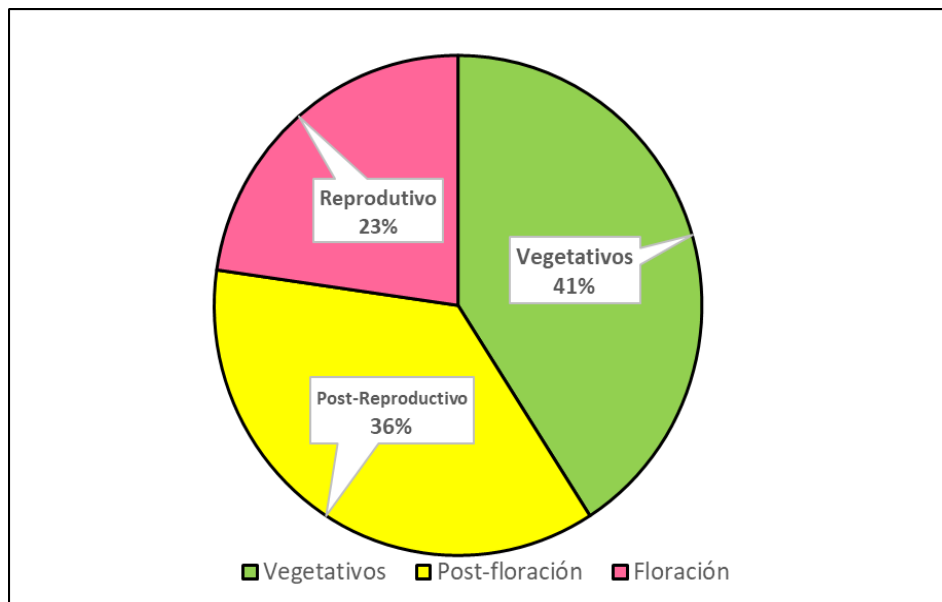


Figura 8. Proporción de ejemplares vegetativos, en estado reproductivo y post-reproductivo de la población de *C. guirigayensis* muestreada en el Estado Mérida.

Con el propósito de visualizar de manera más clara la distribución espacial de los individuos en sus diferentes estados (vegetativos, reproductivos y post-reproductivos) dentro de la población, se realizó un croquis donde se identificaron los individuos según su condición reproductiva (Figura 9).

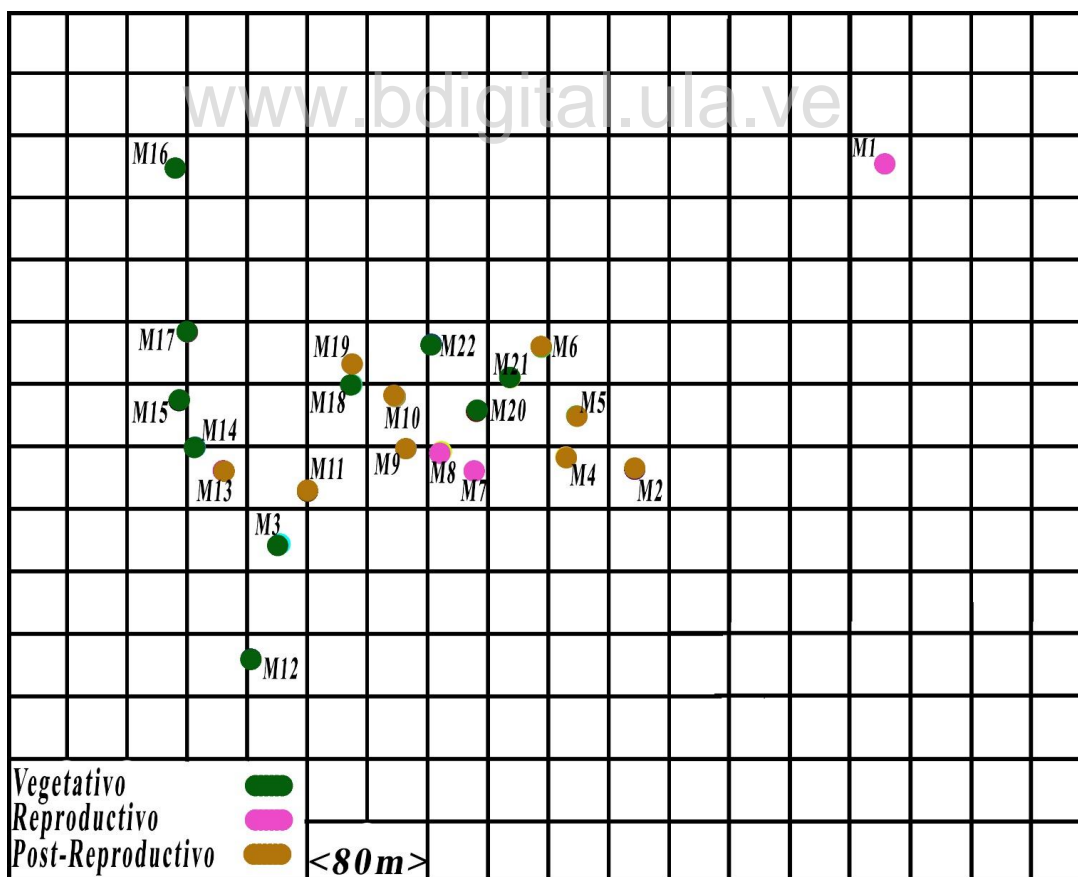


Figura 9. Representación espacial de las 22 macollas de *C. guirigayensis* muestreadas en el Páramo de Piedras Blancas, indicando su estado fenológico.

Tabla 5. Estado reproductivo, altura de los culmos y georreferenciación de los individuos muestreados en la población de *C. guirigayensis* del Edo. Mérida.

MUESTRAS	CONDICIÓN	ALTURA DEL INDIVIDUO (m)	GEORREFERENCIACIÓN	ALTITUD (m snm)
M1	Reproductivo	1,6	Norte: 08° 53' 33,1" Oeste: 70° 57' 28,7"	3799
M2	Post-Reproductivo	1,3	Norte: 08° 53' 35,4" Oeste: 70° 57' 30,9"	3840
M3	Vegetativo	1	Norte: 08° 53' 37,7" Oeste: 70° 57' 31,0"	3851
M4	Post-Reproductivo	1,7	Norte: 08° 53' 35,8" Oeste: 70° 57' 30,8"	3857
M5	Post-Reproductivo	1,3	Norte: 08° 53' 35,7" Oeste: 70° 57' 30,5"	3875
M6	Post-Reproductivo	1,4	Norte: 08° 53' 36,0" Oeste: 70° 57' 30,3"	3890
M7	Reproductivo	1,7	Norte: 08° 53' 36,0" Oeste: 70° 57' 30,3"	3893
M8	Reproductivo	1,6	Norte: 08° 53' 36,6" Oeste: 70° 57' 30,6"	3901
M9	Post-Reproductivo	1,2	Norte: 08° 53' 36,8" Oeste: 70° 57' 30,6"	3903
M10	Post-Reproductivo	1,25	Norte: 08° 53' 37,1" Oeste: 70° 57' 30,6"	3908
M11	Post-Reproductivo	1,7	Norte: 08° 53' 37,5" Oeste: 70° 57' 30,7"	3914
M12	Vegetativo	1,84	Norte: 08° 53' 37,9" Oeste: 70° 57' 31,7"	3908
M13	Post-Reproductivo	1,5	Norte: 08° 53' 38,1" Oeste: 70° 57' 31,7"	3920
M14	Vegetativo	1,38	Norte: 08° 53' 38,3" Oeste: 70° 57' 30,4"	3921
M15	Vegetativo	2,06	Norte: 08° 53' 38,4" Oeste: 70° 57' 29,8"	3924
M16	Vegetativo	1,1	Norte: 08° 53' 38,5" Oeste: 70° 57' 27,8"	3925
*M17	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17a	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17b	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17c	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17d	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17e	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17f	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17g	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17h	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17i	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17j	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
*M17k	Vegetativo	1,69	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3924
**M18	Post-Reproductivo	1,73	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3934
**M19	Post-Reproductivo	1,73	Norte: 08° 53' 58,4" Oeste: 70° 57' 29,3"	3934
M20	Vegetativo	1,01	Norte: 08° 53' 36,1" Oeste: 70° 57' 30,4"	3946
M21	Vegetativo	1,23	Norte: 08° 53' 36,1" Oeste: 70° 57' 30,3"	3950
M22	Vegetativo	1,72	Norte: 08° 53' 36,6" Oeste: 70° 57' 29,9"	3955

* Nivel de muestreo de genet (misma macolla)

** Nivel de muestreo para la coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en la misma macolla.

6.2 Extracción del ADN y estandarización de PCR

Las extracciones de ADN a partir de hojas jóvenes de *C. guirigayensis* se realizaron siguiendo el protocolo propuesto por Cabrera-Ponce (1995), las cuales resultaron exitosas en todos los casos. La cantidad de tejidos foliares se estandarizaron, utilizando cantidades de 10-20 mg, obteniéndose el mayor rendimiento con 20 mg (Figura 10). Las extracciones se visualizaron en geles de agarosa al 0,8%, teñidos con bromuro de etidio (Figura 10).

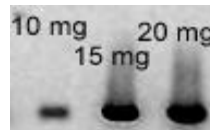


Figura 10. Estandarización del método de extracción de ADN con el método Cabrera-Ponce (1995). Las cantidades de tejido utilizadas para la extracción se muestran en la figura: 10, 15 y 20 mg. Se cargaron 5µl de cada muestra.

Una vez estandarizada la extracción de ADN, se procedió a verificar la calidad de ADN de las extracciones de las 33 muestras colectadas, realizando para ello una corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8%, donde se cargó en cada pozo 5 µl del ADN extraído (Figura 11). Se extrajo ADN de *Phyllostachys aurea* y *Dendrocalamus asper* colectados en el Jardín Botánico de Mérida, estas se utilizaron como controles positivos en las amplificaciones de PCR. El rendimiento de las extracciones de ADN, en términos de calidad y cantidad fue suficiente para realizar todas las amplificaciones por PCR con los distintos marcadores empleados en este estudio.

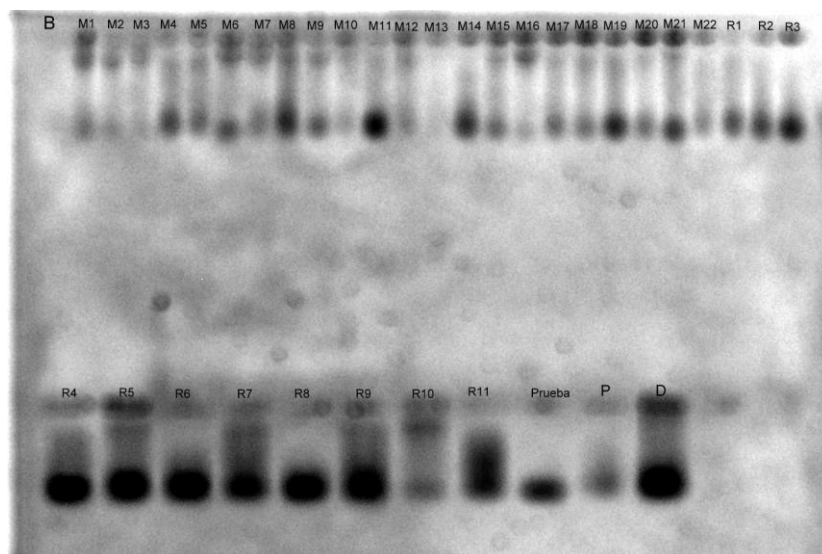


Figura 11. ADN extraído por el método Cabrera-Ponce (1995). Las muestras (M) Nivel poblacional. (R) Nivel de genet (misma macolla). Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. La muestra “Prueba” correspondió al ADN extraído de 20 mg de tejido en el primer ensayo del método de extracción. (B) Blanco. Se cargaron 10µl de cada muestra.

6.2.1 Optimización de las reacciones de PCR (Concentración de ADN y Titulación con MgCl₂)

Las muestras de ADN obtenidas a partir de los diferentes individuos muestreados fueron empleadas como molde para la amplificación por PCR de los marcadores ISSRs. Para comprobar si era necesario diluir la concentración de las muestras, se ensayó con el ADN de individuos que produjeron bandas de gran intensidad en el gel agarosa de la figura 10, con el objetivo de probar si al disminuir la concentración del ADN mejoraba la calidad del amplificado en las reacciones de PCR. Para esto se realizó la amplificación del intrón *rpl16* con la combinación de cebadores *rpl1516/rpl16-F*, probando diluciones 1/10 del ADN extraído de las muestras M5, M16 y R11. Los amplificados obtenidos con estas diluciones se compararon con los obtenidos de las muestras sin diluir (Figura 12).

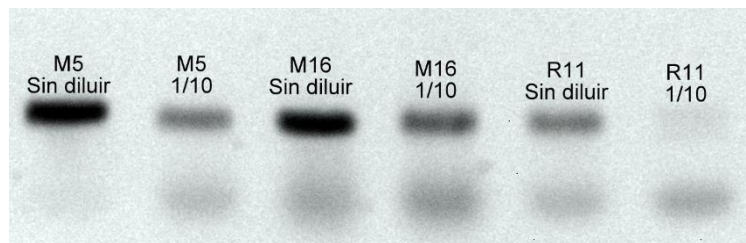


Figura 12. Productos de la amplificación del intrón *rpl16* (cebadores *rpl1516/rpl16-F*) empleando las muestras de ADN diluidas y sin diluir de las muestras de las muestras de *C. guirigayensis* (M5, M16 y R11) (M) Nivel poblacional. (R) Nivel de genet (misma macolla). Se cargaron 5µl/pozo.

Adicionalmente, con el objeto de determinar si la concentración de ADN era adecuada para realizar las amplificaciones por PCR con los marcadores ISSR seleccionados se realizó un ensayo preliminar con uno de los marcadores ISSR, el M13 (Tabla 2), ensayando con diluciones seriadas (1/10, 1/100 y 1/1000) y la muestra sin diluir del ADN extraído para la muestra R11. La mejor amplificación se obtuvo con el ADN sin diluir (Figura 13).

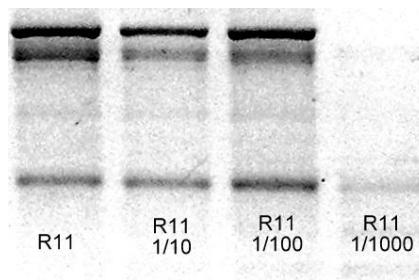


Figura 13. Productos de amplificación del marcador M13 empleando como molde ADN de las diluciones seriadas para la muestra R11. Se cargaron 10µl de cada amplificado.

Sabiendo que el magnesio (Mg²⁺) actúa como cofactor de la enzima ADN polimerasa y se suplementa en concentraciones que deben optimizarse de manera experimental para cada investigación, se realizó un ensayo de titulación con MgCl₂ variando la concentración del mismo entre 1,5-3,5mM.

Un exceso de magnesio produce amplificaciones inespecíficas de productos, mientras que una baja concentración disminuye la producción de amplificadas (Salazar *et al.* 2013). En el ensayo se probó la amplificación de la muestra M16 con los cebadores *rpl1516/rpl16-F* para el intrón *rpl16*. Se obtuvo la mejor calidad de los amplificadas añadiendo 1,2µl de MgCl₂ (25 mM), quedando la concentración final en 3mM. A partir de este ensayo, se resolvió agregar 1,2µl de de MgCl₂ (25mM) en todas las reacciones de PCR para obtener una amplificación más clara y nítida.

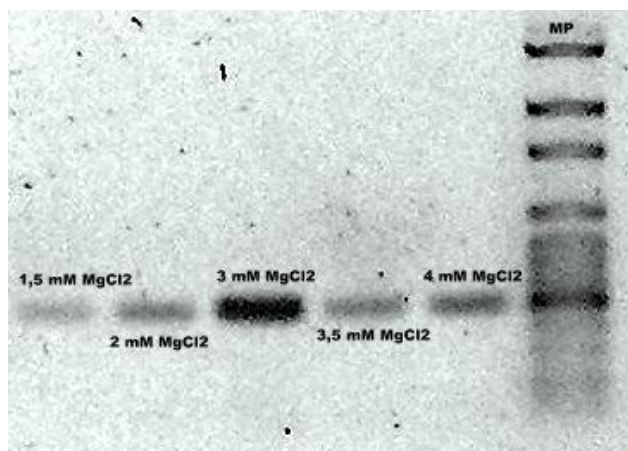


Figura 14. Productos de la amplificación del intrón *rpl16* empleando la muestra M16 como ADN molde durante la titulación con MgCl₂ (25mM) para las reacciones de PCR. MP : Marcador de peso molecular. Se cargaron 10µl de muestra/pozo.

6.3 Amplificación del intrón *rpl16* de *C. guirigayensis*

Las 33 muestras de ADN de *C. guirigayensis* amplificaron positivamente la secuencia del intrón *rpl16*. Con la combinación de cebadores *rpl1516/rpl16-F* (Tabla 2) se obtuvo un producto de aproximadamente 1,1Kb (Figura 15 y Tabla 6); mientras que con la combinación de cebadores *rpl1661/rpl16-F*, amplificaron solo 23 de las 33 muestras incluidas en el presente estudio. Las muestras que no amplificaron luego de repetidos intentos fueron: M4, M10, M14, M15, M16, M17, M18 y M19; R1 y R4) (Figuras 16-18 y Tabla 6). El producto de amplificación con esta última combinación fue de alrededor de 1,4Kb. El tamaño de ambos amplificados coincide con lo reportado para el género *Chusquea* por Kelchner y Clark (1997).

La ausencia de amplificaciones con la combinación *rpl1661/rpl16-F* en diferentes especímenes de bambúes leñosos fue reportado por Kelchner y Clark (1997) en estudios filogenéticos del género *Chusquea*. Al estudiar en detalle la secuencia del cebador *rpl1661*, notaron que ésta contenía aproximadamente 120 pb de la región del exón 38 del gen al que pertenece (subunidad ribosomal grande 16S). Al alinear las secuencias amplificadas del intrón para los géneros *Chusquea* y otros géneros de Bambusoideae que amplificaron para la combinación *rpl1661/rpl16-F*, observaron una mutación puntual para las especies del género *Chusquea* ubicada dentro de las 120pb de la región del

exón, que posiblemente se relaciona con una mutación en el sitio de unión del cebador *rp1661* en las muestras que no amplificaron con la primera combinación. Para resolver ese problema los autores diseñaron un tercer cebador (*rp11516*) a partir del ADN de *Oryza sativa* (arroz) en la región 78,084-78,106. El nuevo cebador posee un sitio de unión más cercano al intrón, eliminando casi completamente los 120pb de la secuencia del exón 38 incluida en la secuencia del cebador *rp1661*, como se pudo corroborar en este estudio (Figura 15).

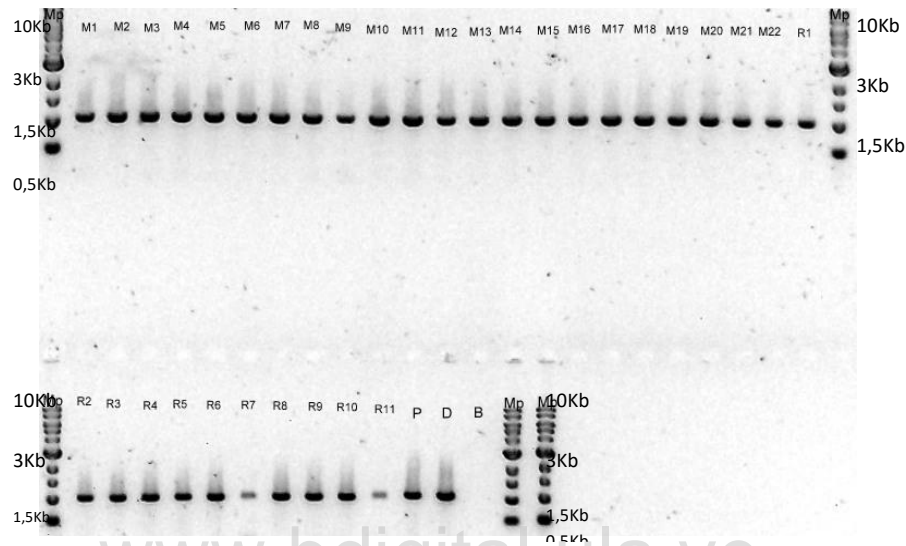


Figura 15. Amplificados del intrón *rp116* utilizando la combinación de cebadores *rp11516/rp116-F*. Los amplificados incluyen todas las muestras de la población de *C. guirigayensis*. Controles positivos: *Phyllostachys aurea* (P) *Dendrocalamus asper* (D). (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Se cargaron 10µl de muestra/pozo.

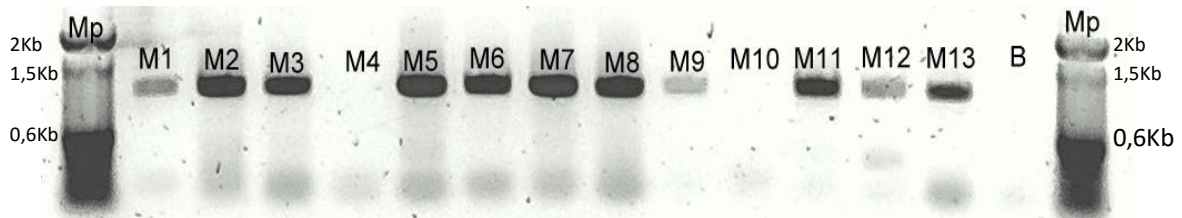


Figura 16. Amplificados del intrón *rp116* utilizando la combinación de cebadores *rp1661/rp116-F*. (M) A nivel de población (1-13 (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Se cargaron 10µl de muestra/pozo.

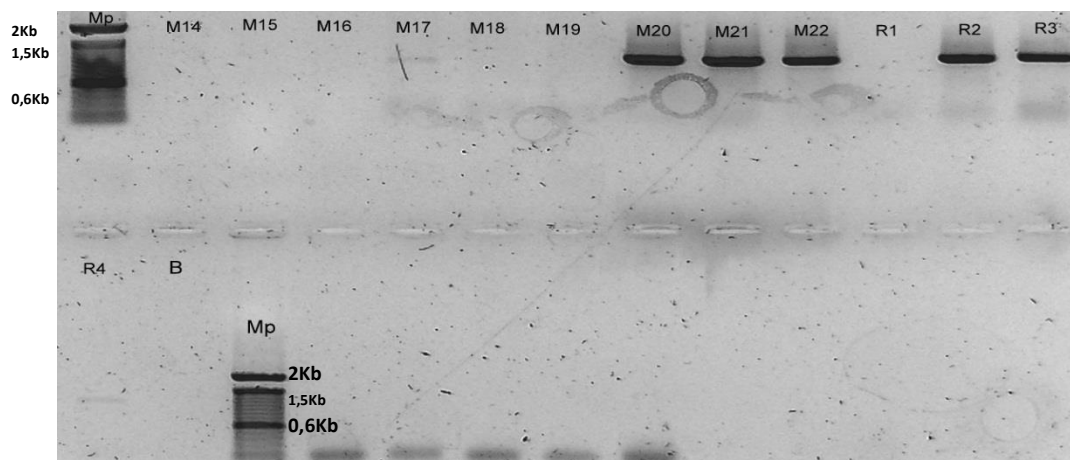


Figura 17. Amplificados del intrón *rpl16* utilizando la combinación de cebadores *rpl1661/rpl16-F*. (M) A nivel de población. (R) Nivel de genet (misma macolla). (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Se cargaron 10µl de muestra/pozo.

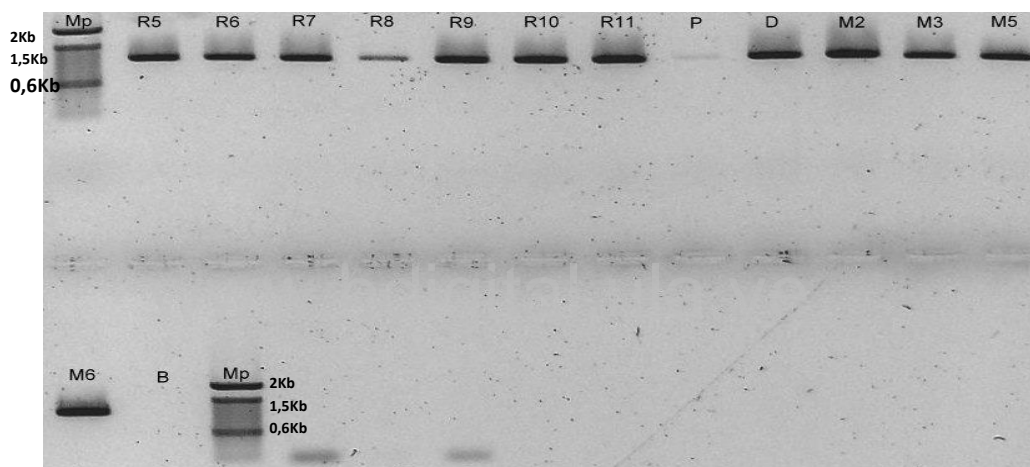


Figura 18. Amplificados del intrón *rpl16* utilizando la combinación de cebadores *rpl1661/rpl16-F*. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Se cargaron 10µl de muestra/pozo.

La siguiente tabla muestra de forma resumida los resultados obtenidos en cuando a la amplificación del intrón *rpl16* con la combinación de los tres cebadores mencionados anteriormente.

Tabla 6. Resultados de la amplificación del intrón *rpl16* con ambas combinaciones de cebadores.

NOMBRE	SECUENCIA	Calidad de la banda	AMPLIFICADOS POSITIVOS	AMPLIFICADOS NEGATIVOS	TAMAÑO (KB)
<i>rpl1516/rpl16-F</i>	5'-CCCTTCATCTCTCTATGTTG-3'	Nítidas	33	0	1,1
<i>rpl1616/rpl16-F</i>	5'-CGTACCCATATTTTCCACCACGAAC-3'	Nítidas	23	10 (M4, 10, 14-19; R1 y 4)	1,4

6.4 Alineamiento de la secuencia amplificada del intrón *rpl16* a partir de ADN de *Chusquea guirigayensis* con las secuencias de *Chusquea* depositadas en el GenBank

A partir de las secuencias y el análisis de los cromatogramas, se obtuvo la secuencia del intrón *rpl16* para *C. guirigayensis* (Tabla 7). Con esta secuencia se realizaron alineamientos con las demás secuencias del género *Chusquea* género depositadas en el GenBank y se construyó un árbol filogenético (Figura 19). *C. guirigayensis* se identifica con color rojo y una flecha roja, tanto en la filogenia dentro del grupo *Euchusquea*, como en el mapa donde se representan las ubicaciones geográficas. El cuadrado rojo señala las otras especies de bambú colectadas y secuenciadas en el estado Mérida por Ely 2009. Cabe destacar que Fisher *et al* (2014) reportan que la filogenia para este género a partir del intrón *rpl16* no se resuelve de manera clara, agrupando las especies más de acuerdo a su ubicación geográfica que a su relación taxonómica con las demás especies del género.

Tabla 7. Secuencia del intrón *rpl16* de *Chusquea guirigayensis* amplificado con la combinación de cebadores *rpl1516/rpl16-F*.

REGIÓN	SECUENCIA	TAMAÑO (KB)	NÚMERO DE ACCESO
Intrón <i>rpl16</i>	<p style="text-align: center;">5'-</p> <p>GAGTAGATCTATCATATAGTTGTAGCAACTGAAATTTTTTCTAAAAAGAAAATAGATTC TAGGTTGTGAAGCAAACTAAAGGGATGGGATAAAGGAGGGATGATAGAAAGAAAGAA GAGGAATAAGAAAAGATATAGGATTCCAATATGTATGGTCTATGAGTTACATCAATAAAGGC AATGTGATAAAGCATCAATAATAAAAAAACAGAGAATCAAAAACAAGAAATAAAAA TTGAAGCAATAATAAAGAGCGGCCCGGGTTAATAAACTGAGAAAATTTACTCGGAAAGA AATTTTTTGGAAAGCTCCATTGTGGGATTCAGACCTAACCTAAAGGAGAAGTAGTGGGAA CGACAGAACCTATGACTGCATAGGATTTTTTTGAAAAGAATCCTAATACTTCATTGGGTGGG ATGCGGAAACCAAAAAATTGCCTTATTTGGTAAGGTTATAATAAATAACAAAT AAGACAGGAAAGAGTAAACATTCGCCGCAAAATCTGGATTCAATAACAGTAAAAATAA GGAGATTTTTTTTAAGAAA-3'</p>	568	No definido

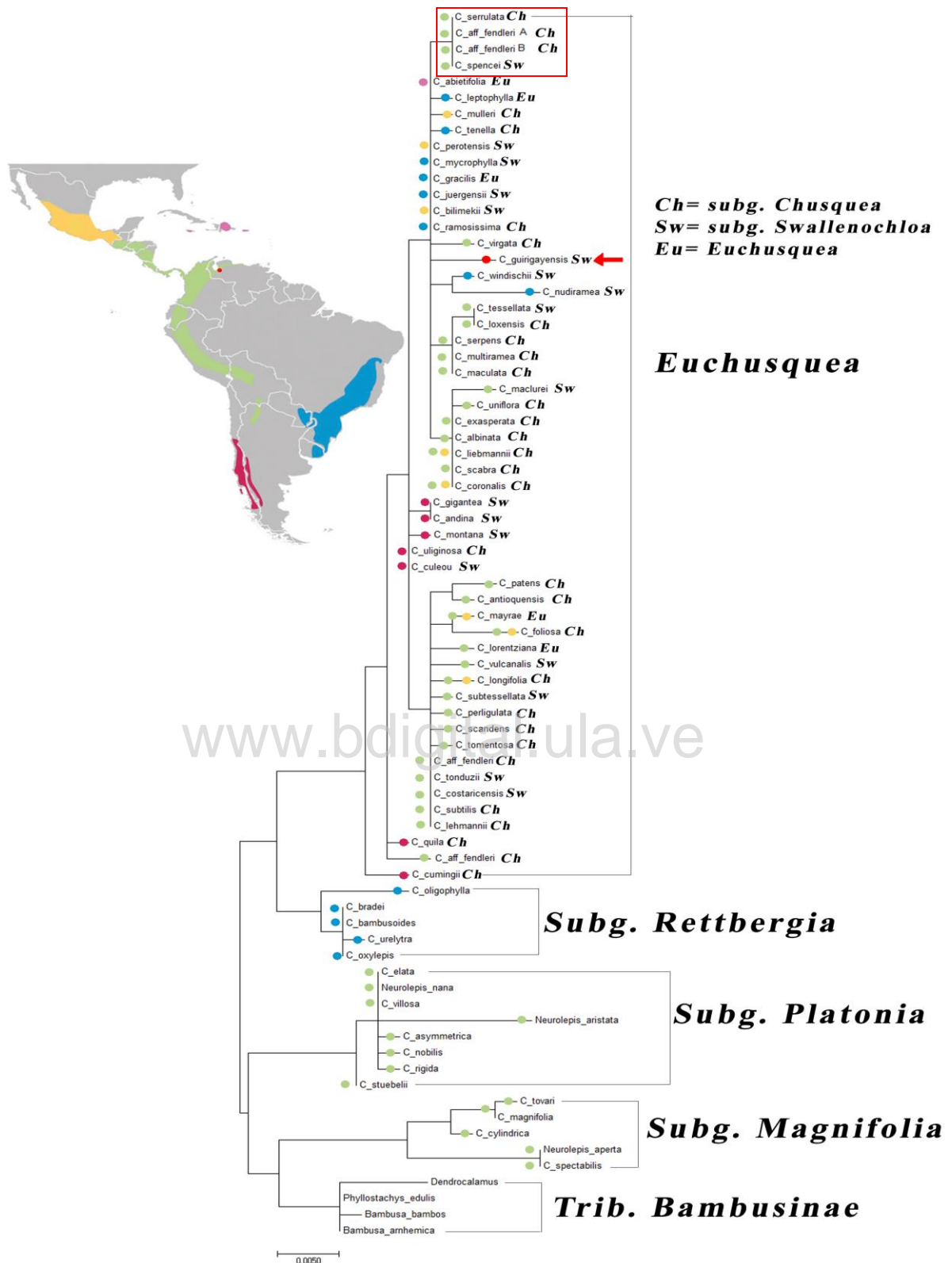


Figura 19. Árbol filogenético a partir de la secuencia del intrón *rpl16* de *C. guirigayensis* utilizando el método *HKY*. Se compara con las secuencias del intrón *rpl16* reportadas para el género *Chusquea*. Como grupos externos se utilizaron las demás especies de la subfamilia Bambusoideae. El cuadrado rojo señala las otras especies de bambú secuenciadas del estado Mérida.

6.5 Segregación inter-específica de los marcadores ISSRs en especies del género *Chusquea*

En la Tabla 8 se resumen las características de las bandas producto de la amplificación de los marcadores ISSR empleados para evaluar la capacidad de los mismos para la detección de segregación inter-específica. Para evaluar el potencial de polimorfismos y discriminación interespecífica de los marcadores seleccionados, se emplearon los cuatro marcadores que presentaban mejor calidad de amplificado (M13, ISSR-2, UBC-810 y UBC-864), con la finalidad de discriminar entre bambúes leñosos, basándonos en los perfiles alélicos de cada especie. El potencial de discriminación interespecífico de estos marcadores se representó con un dendrograma de distancias genéticas (Figura 20), obtenido a partir de la matriz de presencia/ausencia de alelos construido con el programa POPGEN32.

Los cuatro marcadores utilizados para esta prueba amplificaron perfiles alélicos únicos para cada especie, permitiendo diferenciar entre gramíneas herbáceas (*Digitaria sp.*), bambúes leñosos de diferentes géneros (*Chusquea*, *Dendrocalamus* y *Phyllostachys*), entre especies del mismo género *Chusquea* y entre especies del mismo subgénero *Swallenochloa* (Anexo 11, Tabla 8, Figura 20). Las especies del subgénero *Swallenochloa* amplificaron tres alelos comunes con los marcadores UBC-864 (0,3 Kb, 0,4Kb y 0,9Kb, Anexo 11) y UBC-810 (0,3Kb, 0,4Kb y 0,8Kb) exclusivos de este subgénero, que las segregaron de los otros dos bambúes evaluados y de la gramínea herbácea. Esta misma tendencia se observó con los marcadores ISSR-2 (6 alelos: 0,5Kb, 0,7Kb, 0,8Kb, 1Kb y 1,2Kb) y M13 (un único alelo de 0,3Kb) que los separaban fácilmente de *Chusquea fendleri*, *Phyllostachys aurea*, *Dendrocalamus asper* y *Digitaria sp.* (Anexo 11, Tabla 8, Figura 20).

Tabla 8. Características de las bandas producto de la amplificación de los marcadores ISSRs empleados para evaluar su capacidad de detección de polimorfismos inter-específicos entre las especies del género *Chusquea*.

ESPECIES	CALIDAD DE BANDAS	NÚMERO DE BANDAS OBSERVADAS	TAMAÑOS DE LOS AMPLIFICADOS (KB)	TAMAÑOS DE LOS AMPLIFICADOS PARA LAS ESPECIES PROPIAS DE LOS CEBADORES (KB)
<i>Digitaria sp.</i>	Muy intensas	5 – 9	0,1 - 1,9	UBC810: 0,1 UBC864: 0,1 ISSR-2: 0,5-1,02 M13: 0,3-0,55
<i>Phyllostachys aurea</i>	Muy intensas	6 – 8	0,1 - 1,7	
<i>Dendrocalamus asper</i>	Muy intensas	5 – 9	0,9 - 4	
<i>C. fendleri</i>	Muy intensas	5 – 7	0,2 - 4,7	
<i>C. spencei</i>	Muy intensas	6 – 8	0,2 – 1,4	
<i>C. guirigayensis</i>	Muy intensas	4 – 6	0,2 – 1,8	

En el dendrograma basado en distancias genéticas interespecíficas (Figura 20) se aprecia que *Digitaria sp.* segrega en el primer nodo como el grupo más disímil (0,46), seguida de *Phyllostachys* y *Dendrocalamus* (0,50 y 0,55, respectivamente). Las especies del género *Chusquea* se agrupan en los dos últimos nodos, compartiendo una similitud de Nei (1979) de 0,61, *C. fendleri* segrega en el

penúltimo nodo, al pertenecer al subgénero *Chusquea*, quedando en el último nodo *C. guirigayensis* y *C. spencei* (0,67 de similitud) que pertenecen al mismo subgénero.

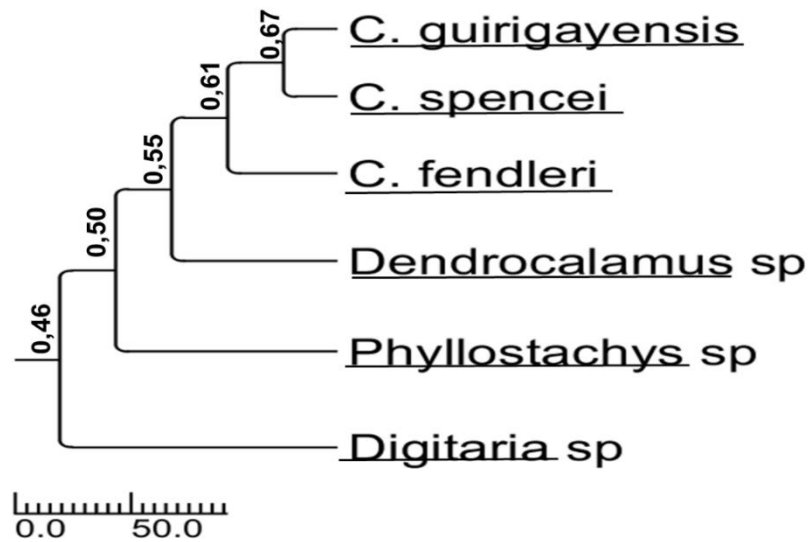


Figura 20. Dendrograma para el análisis de la distancia genética entre las especies del género *Chusquea* y los controles positivos empleados en el estudio.

El análisis de estos perfiles alélicos permitió entonces la segregación de las especies tanto a nivel de subfamilia como de género, subgénero y especie. Una vez verificado el potencial de los marcadores seleccionados, se procedió a realizar las amplificaciones con todas las muestras recolectadas, los resultados se presentan en la siguiente sección.

6.6 Diversidad genética intra-poblacional de *Chusquea guirigayensis* evaluada con los ISSRs como marcadores dominantes

La Tabla 9 agrupa estos resultados para los 12 ISSR marcadores empleados, de los cuales 10 amplificaron exitosamente para todas las muestras y 2 (ISSR-74 e ISSR-3) no amplificaron, pese a repetidos intentos modificando las condiciones de amplificación (temperatura de anillamiento y concentraciones de $MgCl_2$). En la Tabla 9 se indica la calidad y el tamaño de los productos de amplificación obtenidos con las muestras de ADN de *C. guirigayensis* para cada marcador. Las fotografías de los geles de agarosa con los productos de las amplificaciones obtenidas con cada uno de los marcadores evaluados se presentan en los anexos 1 al 10.

La intensidad de las bandas fue clasificada en 4 categorías, según la nitidez del amplificado (Tabla 9). Para los marcadores UBC810, UBC853, ISSR-1 e ISSR-23 se obtuvieron amplificados débiles catalogados como “tenues”. Los marcadores UBC8713, ISSR-33 e ISSR-35 originaron bandas con buena resolución (intensas). Las bandas con mejor resolución se obtuvieron con los marcadores

UBC864, ISSR-2 y M13 (muy intensas). Los productos de los amplificadores variaron desde 0,1Kb hasta 2Kb. Pese a la variación en la intensidad de las bandas, se logró utilizarlas para realizar el registro alélico y la posterior construcción de las matrices binarias, basadas en presencia/ausencia de alelos para el análisis bioinformático, que se utilizó para determinar la diversidad y distancia genética de esta población.

Tabla 9. Características de las bandas producto de la amplificación de los marcadores ISSRs empleados para el estudio de la diversidad genética de *C. guirigayensis*.

NOMBRE	SECUENCIA	CALIDAD	Nº BANDAS	TAMAÑOS DE LOS AMPLIFICADOS PARA <i>C. guirigayensis</i> (KB)	TAMAÑO DE LOS AMPLIFICADOS PARA LAS ESPECIES PARA LAS CUALES SE DISEÑARON (KB)
UBC810	5'- (GA) ₈ T-3'	Tenues	3-4	0,6-1,9	0,1 (<i>D. membranaceus</i>)
UBC853	5'- (TC) ₈ RT-3'	Tenues	4-5	0,6-2,0	0,1 (<i>D. membranaceus</i>)
ISSR-1	5'- (CAC) ₅ -3'	Tenues	2-3	0,6-2,0	0,47-1,4 (<i>P. pubescens</i>)
ISSR-23	5'- (AC) ₈ TA-3'	Tenues	1-2	0,4-1,5	0,5-1,02 (<i>P. kwangsiensis</i>)
UBC873	5'- (GACA) ₄ -3'	Intensas	2-4	0,3-1,6	0,1 (<i>D. membranaceus</i>)
ISSR-33	5'- (AG) ₈ AT-3'	Intensas	3-6	0,3-2,0	0,5-1,02 (<i>P. kwangsiensis</i>)
ISSR-35	5'- (AG) ₈ TA-3'	Intensas	4-5	0,2-2,0	0,5-1,02 (<i>P. kwangsiensis</i>)
UBC864	5'- (ATG) ₆ -3'	Muy intensas	6-7	0,5-2,0	0,1 (<i>D. membranaceus</i>)
ISSR-2	5'- (CAG) ₅ -3'	Muy Intensas	4-7	0,5-1,8	0,5-1,02 (<i>P. pubescens</i>)
M13	5'- (GAGGGTGGNGGNTCT) -3'	Muy Intensas	3-4	0,5-2,0	0,3-0,55 (<i>P. pubescens</i>)
*ISSR-74	5'- (ACTG) ₄ -3'	No amplificó	0	0	0,5-1,02 (<i>P. kwangsiensis</i>)
*ISSR-3	5'- (AC) ₈ TT-3'	No amplificó	0	0	0,5-1,02 (<i>P. pubescens</i>)

* Marcadores que no amplificaron

Cabe destacar que con los resultados de estas amplificaciones, se ratificó la transferibilidad de todos los marcadores ISSRs empleados por Lai y Hsiao (1997) (M13, ISSR-1 e ISSR-2), utilizados anteriormente por Ely (2009). Asimismo, se confirmó también la transferibilidad de los ISSRs (UBC810 UBC853, UBC864 y UBC873) empleados por Yang *et al.* (2012) en especies del género *Dendrocalamus*, al igual que la mayoría de los ISSRs (ISSR-23, ISSR-33 y ISSR-35) utilizados por Lin *et al.* (2010) en *P. kwangsiensis* y *P. bambusoides*.

Los 10 marcadores que amplificaron positivamente resultaron polimórficos en mayor o menor grado. El marcador con mejor detección de polimorfismo entre las 33 muestras colectadas en la población de *C. guirigayensis* fue el ISSR2, el cual amplificó ente 4 y 7 bandas para todas las muestras (Tabla 9 y Anexo 6). Las bandas amplificadas variaron entre 500 y 1800 pb. Todas las muestras con excepción de la macolla 22 y los ramets 4 y 7 compartieron dos alelos, uno de 1000 pb y otro de 1300 pb. Otros marcadores polimórficos con buena capacidad de discriminación entre los genets muestreados fueron los marcadores: UBC810, UBC873, ISSR-35 y el ISRR-33. El marcador UBC-810 amplificó entre 1 y 4 bandas, cuyos tamaños fueron: 620 pb, 1300 pb y 1900 pb y una banda de 620pb que resultó común para todas las macollas y ramets particulares muestreados, a excepción del ramet 7

(perteneciente a la macolla 11) y las macollas etiquetadas como 18 y 22, como se aprecia en el dendrograma de la figura 21 y el anexo 1.

El marcador UBC873 amplificó 2 a 4 bandas en la población, cuyos tamaños variaron entre 330 y 1600 pb (Tabla 9), con un amplificado de 1500 pb común a todas las macollas de la población a excepción de las macollas 2, 18, 22 y el ramet 7 (Figura 21 y Anexo 4). De los 10 marcadores ISSR que originaron amplificados, dos de ellos destacaron por la claridad y reproducibilidad de los amplificados, el marcador ISSR-2 y el marcador ISSR-33 (Tabla 9 y Anexos 1-11). Este último amplificó de 3 a 6 bandas (Tabla 9), incluyendo dos bandas de 800 y 1100 pb que resultaron comunes para todos los genets muestreados a excepción de la macolla 22 (Figura 21 y Anexo 8). Otro marcador que produjo amplificados de excelente calidad fue el UBC864, originando entre 6 y 7 bandas (Tabla 9 y Anexo 3), de las cuales las de 600 y 2000 pb resultaron polimórficas.

En el caso de Los marcadores M13 y UBC853, también se obtuvieron amplificados de buena calidad y reproducibles; sin embargo, el número de bandas amplificadas era generalmente muy inferior al obtenido con los otros marcadores, obteniéndose típicamente dos bandas, y excepcionalmente 3 a 4 (Tabla 9). El marcador M13 originó bandas de 600, 1500 y 2000 pb, de las cuales la de 600 pb resultó común para 31 de las 33 muestras, donde las excepciones estuvieron representadas por las macollas 1 y 22 (Figura 21 y Anexo 10). Una tendencia similar se observó con el marcador UBC853, dado que 29 de las 33 muestras compartieron una banda de 620 pb. La ausencia de esta banda segregó en el análisis a las macollas 1, 8, 12 y 22 (Figura 21 y Anexo 2).

Los marcadores ISSR-1 e ISSR-23 originaron amplificados tenues, difíciles de visualizar, cuya reproducibilidad resultó inconsistente, originando de 2 a 6 bandas, cuyos tamaños variaron entre 400 y 2000 pb, respectivamente (Tabla 9 y Anexos 5 y 7). La baja calidad de amplificados obtenidos en ambos casos se atribuyó a dos causas: una baja incidencia de los motivos repetidos en el genoma de las muestras amplificadas o a la presencia de amplificaciones inespecíficas.

6.6.1 Diversidad genética a nivel Poblacional (intra-poblacional)

La siguiente Tabla 10 reúne los valores calculados para los índices de diversidad basados en las matrices de similitud, construidas a partir del análisis de las fotografías de los geles de agarosa. El número total de loci observados para la especie, de acuerdo al estudio intra-poblacional fue de 94, de los cuales el porcentaje de loci polimórficos correspondió al 79,79% (75 loci). El número de alelos efectivos de esta población resultó 1,36. Se encontraron 22 haplotipos diferentes de 22 individuos

muestreados. El índice de diversidad de Nei ($H_{e\ gen}$) fue de 0,23; estos valores se encuentran dentro del rango de los valores reportados para plantas que presentan tasas equivalentes de reproducción sexual y asexual; estos datos concuerdan con los resultados encontrados para el índice H_{Tajima} (0,23). Se obtuvo un valor para el índice de Shannon (SI) de 0,35. El índice de diversidad total (H_T) correspondió a 0,23, que también está en el rango de plantas con tasas de reproducción sexual y asexual equivalentes. El índice G_{ST} fue de 0,22, indicando una alta diversidad genética en la población. El índice de haplotipos de Nei ($H_{nei\ haplotipos}$) arrojó un valor de 1; este índice se basa en los diferentes haplotipos presentes en la población, por lo que, según este resultado, todos los haplotipos resultaron ser diferentes, sugiriendo entonces que todas las muestras poseen genotipos diferentes, apoyando la diversidad reflejada en el índice de G_{ST} .

Al igual que en la sección anterior, los valores de similitud de Nei (1979) fueron utilizados para construir un dendograma (Figura 21) con el fin de apreciar de forma más clara la distancia genética entre los 22 individuos muestreados dentro de la población de *C. guirigayensis*. En dicho dendograma, cada nivel de muestreo tiene un color diferente: el nivel de genet se representa con el color azul oscuro; el nivel poblacional con el color rojo oscuro y el tercer nivel, es decir, el de la coexistencia de ramets fértiles vs ramets vegetativos en una misma macolla, se observa de color amarillo. Los valores de similitud de Nei (1979) entre 0,88 y 1 se utilizaron como criterio para la identificación de los ramets de un mismo genet (Eguiarte *et al.* 2007).

Se puede observar que los valores de similitud para todos los individuos presentados en la Figura 21 son altos, variando de 0,8 hasta 0,92, reflejando una corta distancia genética entre los individuos de la población. De los 22 individuos que se colectaron se obtuvieron 4 ramets, señalados con un cuadrado de color rojo en la figura 21, y 18 individuos diferentes. En el primer nodo del dendograma (nodo basal), con un valor de similitud de Nei (1979) de 0,89, las reúne a M22 y R7 como ramets del mismo genet. El siguiente nodo, representando ramets de un mismo genet agrupa a las muestras M5 y M6 como clones de un mismo genet, con un valor de similitud de 0,88. En el último nodo, con valores desde 0,89 hasta 0,92, reúne a M13 como ramet del mismo genet al cual pertenecen las muestras R1, R3, R4, R5 y R8.

6.6.2 Diversidad genética a nivel de Genet, tomando diferentes ramets en una misma macolla

El número de alelos efectivos dentro de la misma macolla resultó de 1,27. Para los 11 ramets se obtuvieron 11 haplotipos diferentes, reflejado en el índice de haplotipos de Nei ($H_{nei\ haplotipos}$), cuyo valor fue de 1 (Tabla 10). El número total de loci polimórficos correspondió a 51, representando el

54,26%. Estudiando los individuos pertenecientes a una misma macolla, se obtuvieron valores más bajos para todos los índices evaluados, en comparación con el nivel poblacional, a excepción del G_{ST} , que indica una menor diversidad genética (0,47). Los valores de los índices de diversidad de Nei y Shannon fueron de 0,17 y 0,26, respectivamente, mientras que el índice de diversidad total (H_T) para la misma macolla fue de 0,17 (Tabla 10).

Cuando la diversidad de haplotipos se analizó en función de las distancias genéticas en el dendrograma (Figura 21, señalados en azul), de los 11 ramets colectados de la misma macolla, solo 5 de ellos correspondieron a genets diferentes; un primer genet de mayor tamaño compuesto por las muestras R1, R3, R4, R5, R8 y M13 (valor de similitud de Nei-Li (1979) entre 0,88 y 0,92), el segundo genet que reúne a los ramets R2, R6 y R10 (0,89 y 0,90 de similitud), el tercero compuesto por las muestras R7 y M22 (0,89 de similitud), el cuarto por R9 y el quinto por R11 (Figura 21).

Tabla 10. Índices y parámetros de diversidad genética obtenidos con los marcadores ISSRs para *C. guirigayensis* en todos los niveles de estudio.

Niveles de estudio	N	$N^{\circ} H$	N_a	N_e	L_T	L_P	$\%L_p$	H_{Tajima}	H_{nei} haplotipos	$H_{e\ gen}$	SI	G_{st}	H_s	H_T
Nivel Poblacional	22	22	1,79 ± 0,4	1,36 ± 0,33	94	75	79,79	0,23±0,18	1 ± 0,01	0,23 ± 0,17	0,35 ± 0,24	0,22	0,21 ± 0,02	0,23 ± 0,03
Nivel de genet (misma macolla)	11	11	1,54 ± 0,5	1,27 ± 0,33	94	51	54,26	0,18±0,19	1 ± 0,01	0,17 ± 0,18	0,26 ± 0,26	0,47	0,13 ± 0,03	0,17 ± 0,03
Nivel coexistencia fértiles VS vegetativos	2	2	1,29 ± 0,45	1,29 ± 0,49	94	27	29	X	X	X	X	X	X	X
Nivel Poblacional + Nivel de genet (misma macolla)	33	33	1,84 ± 0,37	1,36 ± 0,32	94	79	84,04	0,20±0,16	1 ± 0,01	0,23 ± 0,17	0,36 ± 0,23	0,16	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,03

(N) Número de individuos; ($N^{\circ} H$) Número de haplotipos; (N_a) Número de alelos observados; (N_e) Número de alelos efectivos; (L_T) Loci totales; (L_P) Loci polimórficos; ($\% L_p$) Porcentaje de loci polimórficos; (H_{Tajima}); Índice de Nei haplotipos ($H_{nei\ haplotipos}$); ($H_{e\ gen}$) Diversidad genética de Nei; (SI) Índice de Shannon; (H_s) Diversidad genética entre sub-poblaciones; (H_T) Diversidad genética total; (G_{st}) Índice de diversidad para todas las múltiples subpoblaciones. Los índices de H_{Tajima} , $H_{nei\ haplotipos}$, $H_{e\ gen}$, SI , G_{st} , H_t , tienen un rango de valores entre 0 y 1, donde 0 corresponde a un número mayor de clones y 1 representan una diferencia total entre todas las muestras (máximo de diversidad genética).

6.6.3 Diversidad genética a nivel de coexistencia de ramets fértiles senescentes y vegetativos en un mismo genet

Esta prueba fue realizada con dos ramets, presumiblemente parte de un mismo genet (uno fértil senescente y uno vegetativo vigoroso), que resultaron pertenecer a diferentes genets, para los cuales el porcentaje de loci polimórficos fue del 29% (tabla 10). Sin embargo, los perfiles alélicos revelaron múltiples alelos diferentes entre estas dos muestras (anexos 6 y 9), correspondientes a los perfiles amplificados con los marcadores ISSR-2 e ISSR-35, respectivamente. El número de alelos efectivos

obtuvo un valor de 1,29, valor cercano al de la población (1,36). Se obtuvieron 2 haplotipos diferentes, a partir de los 2 ramets muestreados, pero a diferencia de los individuos que se consideraron clones en la población, con variaciones en más de cuatro alelos, lo cual los segregan en nodos diferentes (Figura 21, señaladas en color amarillo), con una similitud de 0,80.

Típicamente, la clonalidad en las poblaciones de plantas se estima en función del número de haplotipos diferentes en una población; sin embargo, la estimación de clones en esta población no se pudo realizar con el número de haplotipos comunes, ya que no se conoce el grado de variación somaclonal de esta especie, ni de la subfamilia Bambusoideae (Silvertown 2008); por esto, estimamos los clones según el criterio de Eguiarte *et al.* 2007. Las muestras consideradas clones (distancia de Nei-Li (1979) muy cercana con otras muestras) presentaron haplotipos diferentes entre ellas, es decir, compartían la mayoría del total de 94 alelos amplificados con los ISSR con otras muestras de *C. guirigayensis*, pero presentaban entre uno y cinco alelos únicos que las distinguió de las demás muestras recolectadas (como lo reportado por Kitamura y Kawahara 2009 en bambúes asiáticos).

La comparación de los perfiles alélicos amplificados, se realizó partiendo del criterio de que los clones debían compartir una elevada similitud en términos de alelos compartidos, el cual debía superar el 88% del total de alelos amplificados (como lo reportado por Silvertown 2008; Kitamura y Kawahara 2009), lo cual equivalía a diferencias de 1-2 alelos para un mismo marcador y 5 alelos para marcadores diferentes. De acuerdo a nuestro análisis existen al menos cuatro clones en la población muestreada, las cuales explicaremos a continuación.

Según el análisis de distancia genético de Nei y Li (1979) (Figura 21 y Figura 22), el último nodo reúne a las muestras que comparten mayor similitud genética (>89%) que nos permitieron catalogarlos como clones. Este nodo representa al clon de mayor tamaño, que reúne 5 ramets de la macolla 17 (1, 3, 4, 5 y 8) y a la macolla 13 (nodo 8 en el dendrograma de la Figura 21). Este grupo comparte un perfil alélico que difiere en apenas 5 alelos, del total de 94 alelos obtenidos con los 10 marcadores amplificados. El ramet 1 (macolla 17) difiere con los restantes del mismo nodo por la presencia de un alelo de 620 pb correspondiente al marcador UBC-810; el ramet 5 (macolla 17) por la presencia de un alelo de 500 pb, correspondiente al marcador ISSR-35; el ramet 4 (macolla 17) por la presencia de un alelo de 2000 pb, producto del amplificado con el marcador M13 y el ramet 8 por la presencia de un alelo de 1600 pb con el marcador ISSR-33. A su vez, la macolla 13 difirió del resto por la ausencia de un alelo amplificado con el marcador M13, de 700 pb (Figura 21 y Anexo 11).

El siguiente clon de mayor tamaño, reúne únicamente a los ramets 2, 6 y 10 de la macolla 17 (nodo 7 en el dendrograma de la Figura 21), los cuales difieren también en solo cinco alelos; el ramet 2 difirió por la ausencia de dos alelos, uno de 1300 y una de 1600 bp, correspondientes

al marcador ISSR-35. Por otro lado, el ramet 6 difirió de 980 pb con el marcador ISSR-33, mientras que el ramet 10 difirió en un único alelo de 580 pb, correspondiente al marcador UBC-810 (Figura 21 y Anexo 1).

El tercer clon identificado en este estudio (nodo 2, dendrograma Figura 21), conformado por el ramet 7 de la macolla 17 y la macolla 22, los cuales difirieron en solo tres de los 94 alelos obtenidos para esta especie. La macolla 22 se diferenció del ramet 7 por la presencia de un alelo de 400 pb con el marcador ISSR-23 y la presencia de dos alelos amplificadas con el marcador M13, uno de 1500 pb y otro de 2000 pb (Figura 21 y Anexo 11).

Las macollas 5 y 6 (nodo 5 en el dendrograma de la Figura 21), según nuestro análisis forman parte un mismo clon, variando en solo cinco bandas en su perfil alélico a saber: la macolla 6 varió con un amplificado de 726 pb con el marcador UBC-8713 y por la ausencia de un amplificado de 900 pb con el mismo marcador, mientras que la macolla 5 difirió en dos alelos por la ausencia de los alelos 736 y 791 pb con el marcador UBC-864 y la ausencia de una banda de 1500 pb con el marcador ISSR-1 (Figura 21 y Anexos 5 y 7).

www.bdigital.ula.ve

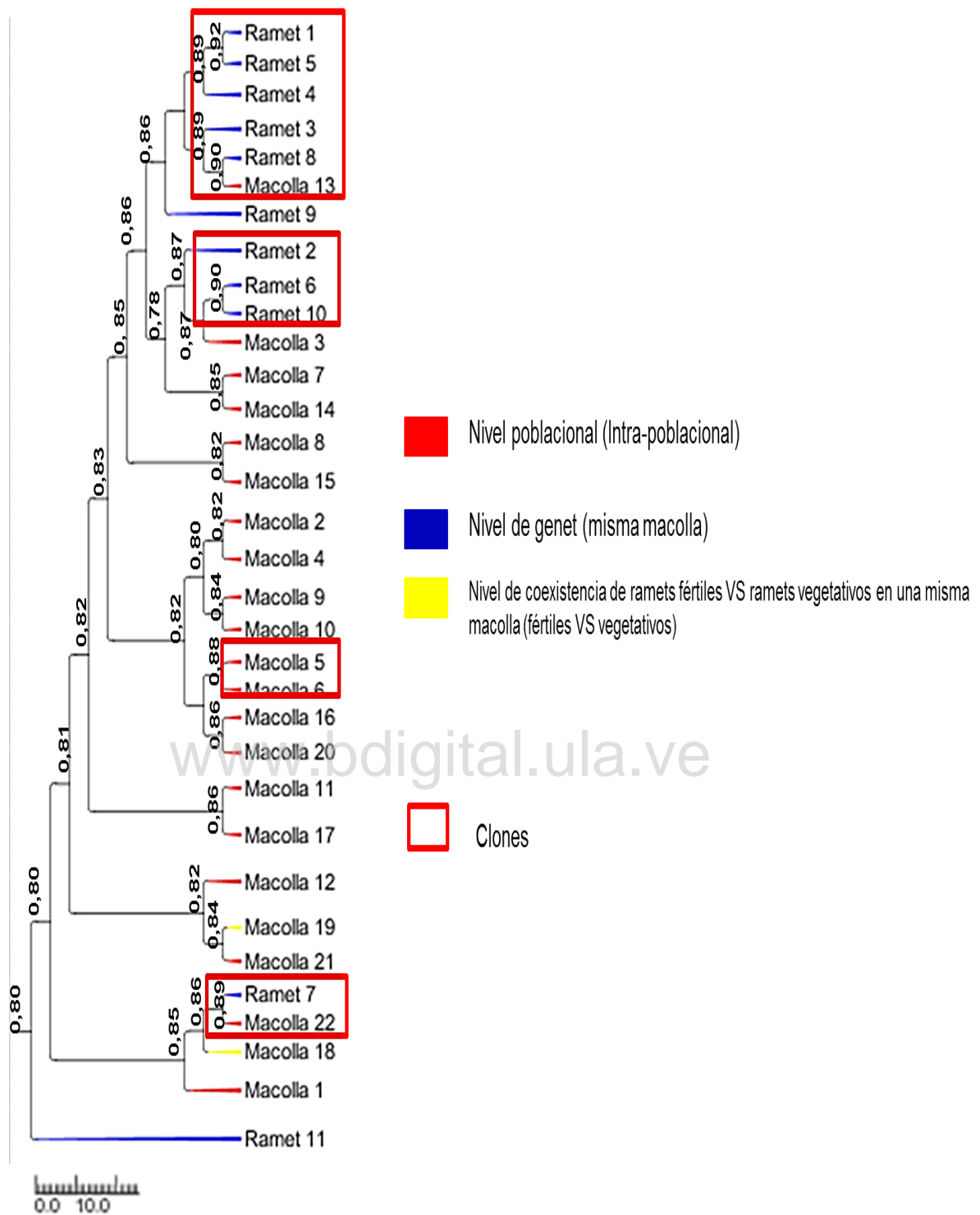


Figura 21. Dendrograma para los tres niveles de muestreo basado en las distancias de Nei (Nei 1973). Se empelaron los 94 loci amplificados con los 10 marcadores ISSRs para los cuales se obtuvo amplificación exitosa. El color azul denota ramets muestreados en mismo genet (misma macolla); el color rojo denota macollas diferentes (a nivel poblacional) y el color amarillo denota ramets fértiles y vegetativos muestreados en una misma macolla. Los cuadrados rojos reúnen los clones identificados en la población. Los números sobre las ramificaciones representan el valor de similitud de Nei-Li (1979) (S/G).

El croquis de la Figura 22 ilustra la distancia física entre los clones muestreados (en metros lineales), separados por una distancia mínima de 20 metros. Cada genet se identifica con colores diferentes. Los clones se identifican con el color específico del genet al cual pertenecen. En este estudio se obtuvieron 24 genets diferentes de las 33 muestras colectadas. Como se hizo mencionó anteriormente, de las 11 muestras colectadas de la misma macolla se obtuvieron 5 genets diferentes; el de mayor tamaño conformado por las muestras M13, R1, R3, R4, R5 y R8 (color rosado), y tres genets conformados por las muestras: R2, R6 y R10 (rojo ladrillo), R7 y M22 (azul) y R9 (verde mate) y R11 (naranja). En el último nivel de muestro, donde se colectó un ramet fértil senescente y otro vegetativo vigoroso, presumiblemente pertenecientes a un mismo genet, resultaron pertenecer a genets diferentes M18 (azul turquesa) y M19 (gris), pese a su cercanía física (50cm) (Figura 22).

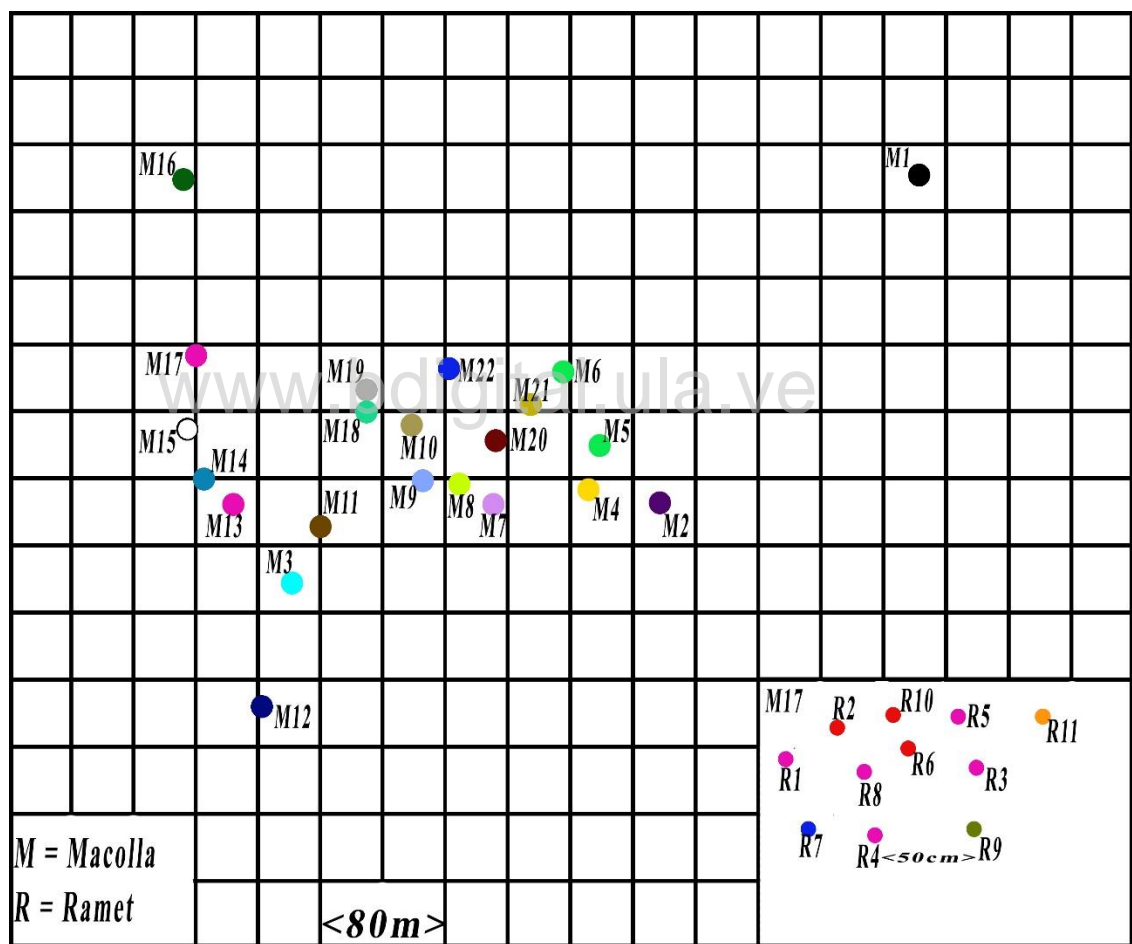


Figura 22. Distribución física de las 33 muestras colectadas en la población de *C. guirigayensis* identificando los ramets y genets. Los 13 genets diferentes recolectados en la población se identifican con colores diferentes. Los 13 ramets agrupados en estos genets se reconocen con los mismos colores entre ellos. Cada cuadrado en el croquis representa una distancia de 1600 m². En el cuadrado M17 se ubican los 11 ramets colectados en el nivel 2 del muestro para la Macolla 17.

7 Discusión

7.1 Caracterización geográfica de la población de *C. guirigayensis* del Páramo de Piedras Blancas, sector Los Romeros-Mifafi, en el Estado Mérida

La población de *C. guirigayensis* ubicada en el sector Mifafi-Páramo de Los Romeros ocupa una superficie inferior a tres hectáreas. Se extiende en una ladera montañosa húmeda, a lo largo de un gradiente elevacional de aproximadamente 150m, desde 3750 hasta 4000 m snm. Esta ladera colinda con la naciente de una quebrada que origina aguas abajo el Río Los Romeros, que delimita a la población desde su extremo norte hasta la parte más baja de la ladera.

La orientación lacustre, de frente a la planicie que limita con el Sur del Lago de Maracaibo proporciona vientos húmedos que crean un microambiente más húmedo en torno a la población, que difiere marcadamente de las condiciones climáticas típicas del páramo de Piedras Blancas, descrito por los especialistas como un páramo desértico (Monasterio 1979), que deben limitar en gran medida el establecimiento y sobrevivencia de plántulas y por lo tanto la distribución de esta especie. Este microambiente más húmedo favorece el desarrollo y permanencia de *Chusquea guirigayensis* en este ecosistema de páramo altiandino, atípico de bambúes leñosos, sin embargo, el hecho de que esté rodeado de montañas y valles interandinos, limita la mayor dispersión de polen y semillas de la población en el ecosistema páramo (Ely *et al.* 2014). Las limitaciones en la dispersión de polen y semillas debido a barreras geográficas restringen el flujo de genes y disminuyen la diversidad genética de la población.

Dadas las singulares características de su ubicación, esta población de *C. guirigayensis* podría concebirse como una isla biogeográfica de acuerdo con los criterios establecidos por Patino *et al.* (2017), quienes discutieron la actualización del concepto propuesto por MacArthur *et al.* (1963). Según estos nuevos criterios, una isla biogeográfica se distingue por la restringida distribución de una población y cómo ésta influencia las características micro-climáticas para la especie más abundante de esa bio-isla.

7.1.1 Caracterización fenotípica y fenológica de los individuos de la población

Niño *et al.* (2006), describieron a *C. guirigayensis* con base en la población hallada en el Monumento Nacional Guirigay-Teta de Niquitao, Edo. Trujillo, que presumían representaba la única población de las especies, hasta que Ely (2009) corroboró la existencia de una población en el Páramo de Piedras Blancas-Los Romeros. La descripción original reporta un tamaño de culmos de 30-80 cm. Posteriormente, Kiyota (2011) reportó para la población del Páramo de Piedras Blancas, sector los

Romeros-Edo. Mérida, tamaños de culmos de 20-120 cm y en el presente estudio, las longitudes de culmos reportadas fueron de 30-200 cm.

Los estudios fenológicos en bambúes leñosos americanos de alta montaña son limitados, por lo que esta investigación aportó información relacionada con los ciclos de floración en este grupo. Hasta el momento se ha observado que los bambúes de alta montaña del subgénero *Swallenochloa* presentan ciclos de floración más cortos en comparación a los largos ciclos de floración de las especies de bambúes leñosos de bosques nublados andinos, los cuales se han catalogado como de floración “continua” por el hecho de que a lo largo del año, siempre existen algunos genets en flor (Horn y Clark 1992 Judziewicz *et al.* 1999; Ely *et al.* 2018).

La suposición de que esta especie presenta un patrón de floración continua, se apoya en las observaciones de Ely (comunicación personal), quien afirma que en visitas regulares a la población de *C. guirigayensis* durante los años 2008, 2009, 2010, 2011, 2017 y 2018 se han registrado numerosos genets en floración, alternando con genets vegetativos, lo cual sugiere un patrón de floración de tipo asincrónico, continuo.

Otra particularidad de *C. guirigayensis*, es la elevada proporción de genets fértiles, observada por Ely (comunicación personal), corroborada en el presente estudio, la cual es superior a la proporción observada en otras especies del mismo subgénero de ecosistemas parameros como *C. spencei*. Pese a encontrar genets en diferentes estados de floración en todas las visitas realizadas a la población, no se encontraron cariopsis ni plántulas, y la proporción de plantas juveniles es muy baja, hecho que coincide con lo reportado por Horn y Clark (1992) para una población de *C. subtessellata* (especie de alta montaña del subgénero *Swallenochloa*), en la cual solo en pocas ocasiones se encontraron flores con estructuras reproductivas viables.

Aun cuando los ciclos de floración son cortos, continuos o esporádicos, en las poblaciones de *C. guirigayensis* sería necesario realizar un seguimiento continuo durante un periodo de floración para establecer cuál es la contribución de la reproducción sexual en la generación de organismos nuevos y sobre la variabilidad genética en la población.

En la población de *C. guirigayensis* de la localidad Piedras Blancas-Los Romeros, se observa un alto nivel de entrecruzamiento ya que las 33 muestras de la población exhibieron 80% o más en el porcentaje de similitud basado en la distancia de Nei-Li (1979). Se puede descartar que los altos niveles de similitud entre las 33 muestras de *C. guirigayensis* se deban a la autogamia, ya que los bambúes poseen una floración proterándrica (los estambres maduran antes que los estigmas), típica de las especies de la familia Poaceae, lo que favorece la alogamia (fecundación cruzada) (Green *et al.* 1997; Judziewicz *et al.* 1999; González 2001).

Los altos niveles de similitud que existen entre los individuos de la población de *C. guirigayensis* objeto de nuestro trabajo, pueden deberse al escaso, o más bien nulo, flujo génico que existe entre esta especie de bambú y sus alrededores, por lo que el entrecruzamiento debe jugar un rol importante, haciendo que de alguna manera todos los individuos estén emparentados.

Es preciso destacar, además, que el intercambio de material genético entre esta población y la población del estado Trujillo es nulo, ya que se ha reportado una corta viabilidad del polen y de las semillas para especies de este sub-género, cuyo método de dispersión es anemófilo (Horn y Clark, 1992; Judziewicz *et al.* 1999), por tal razón, ya que la población del Páramo de Piedras Blancas se encuentra en un valle rodeado por montañas, la dispersión del polen y/o las semillas por grandes distancias es remota.

7.1.2 Relación filogenética de *Chusquea guirigayensis* con otras especies del género *Chusquea* basado en la secuencia del intrón *rpl16*

Los resultados obtenidos en nuestro análisis filogenético empleando la secuencia del intrón *rpl16* de *C. guirigayensis*, ubicaron a tal especie dentro del grupo de *Euchusquea*, compuesto por las especies de los subgéneros *Chusquea* y *Swallenochloa* (Figura 19). Sin embargo, el cladograma revela acentuadas politomías para el género; razón por la cual, *C. guirigayensis*, no segrega en un mismo subgénero, junto con las otras especies de *Swallenochloa*, dentro del clado *Euchusquea*, sino que se agrupa en nodos cercanos con otras especies que incluyen representantes del subgénero *Chusquea* de la Cordillera de Mérida (*C. serrullata*, *C. aff. fendleri* A, *C. aff. fendleri* B) y una sola especie del subgénero *Swallenochloa* (*C. spencei*).

Fisher *et al.* (2014) atribuyen las politomías observadas en el clado *Euchusquea* a la reciente divergencia en el linaje, por lo que las especies nacientes retienen múltiples haplotipos ancestrales. Por tanto, las relaciones genéticas cloroplastídicas entre las especies de *Euchusquea* están muy desvinculadas de su relación filogenética o de sus caracteres morfológicos, éstas obedecen más bien a su cercanía geográfica, como se aprecia en el cladograma, donde se agrupan por regiones y no por parentescos (Figura 19).

Dado que *Euchusquea* puede haber sufrido recientemente una radiación de especies o puede estar diversificándose en la actualidad, es razonable inferir que la clasificación incompleta de linajes explique, en parte, la incongruencia observada entre los genes del cloroplasto y las hipótesis morfológicas para las relaciones taxonómicas.

De acuerdo con nuestros resultados, el intrón *rpl16* no aporta una distinción taxonómica definida entre las especies del género *Chusquea*, a pesar de ser esta la región del cloroplasto que típicamente es

utilizada para la filogenia de las distintas especies de bambúes asiáticos (Kelchner y Clark 1997; Kelchner *et al* 2013; Fisher *et al.* 2014). Debe tomarse en cuenta, además, que para realizar inferencias filogenéticas precisas es necesario valerse de la información de múltiples secuencias genómicas; un ejemplo de ello es el trabajo de Fisher *et al* (2014), quienes sugirieron la separación del género *Chusquea* en 5 subgéneros, basándose en la separación filogenética obtenida por las secuencias de 6 regiones del genoma (*ITS*, intrón *ndhA*, gen *ndhF*, intrón *rpl16*, *trnD-trnT*, *trnT-trnL*). Sin embargo, como se dijo anteriormente, utilizando las secuencias de esas 6 regiones, la resolución obtenida para el clado *Euchusquea* (clado donde se encuentra el subgénero *Swallenochloa*) no les permitió distinguir con claridad entre los diferentes subgéneros y especies.

7.2 **Discriminación inter-específica y detección de polimorfismo de los marcadores ISSR en especies del género *Chusquea***

Los marcadores de tipo ISSRs son comúnmente empleados en especies de bambúes asiáticos, ya sea para la distinción de híbridos, la cobertura y distribución de los clones, para conocer la diversidad genética de especies, poblaciones e individuos; entre otras. Sin embargo, en especies de bambúes americanos solo algunos estudios como el realizado por Ely (2009) y Rugeles-Silva *et al* (2012), utilizan marcadores de tipo ISSR para responder preguntas de índole genético en estas especies.

Durante nuestra investigación probamos la calidad de amplificación de 12 marcadores diferentes de tipo ISSRs, a su vez también probamos la discriminación de 4 de esos marcadores (M13, ISSR-2, UBC-810 y UBC-864) en distintos niveles taxonómicos, a saber: familia, subfamilia, género, subgénero y especie. En ambos aspectos, tanto en la calidad de las amplificaciones como en el nivel de discriminación, obtuvimos buenos resultados.

Con 10 de los 12 marcadores ISSRs se obtuvieron bandas reproducibles y de buena calidad. El análisis realizado para evaluar la discriminación de los marcadores ISSRs en diferentes niveles taxonómicos, identificó bandas compartidas para las especies del mismo subgénero, género y subfamilia (catalogadas así de acuerdo con la caracterización sistemática), permitiendo a su vez, detectar bandas especie-específicas capaces de diferenciar individuos diferentes, un ejemplo de ello fue la distinción entre los diferentes individuos de la población de *C. guirigayensis* del Páramo de Piedras Blancas, Sector Los Romeros.

La transferibilidad inter-específica de los marcadores ISSRs en otras especies diferentes a las empleadas para el diseño de los cebadores ha sido demostrada con anterioridad (Akagi *et al.* 1996; Sankar y Moore 2001; Lin *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012); sin embargo, hasta la fecha, solo Ely (2009)

probó la transferibilidad de tres marcadores de tipo ISSRs diseñados para especies de bambúes asiáticos en especies de bambúes americanos (M13, ISSR-2, ISSR-3), obteniendo una buena reproducibilidad, calidad de amplificado y discriminación a nivel inter- e intra-específico, probando con tres especies del género *Chusquea* de la Cordillera de Mérida (*Chusquea multiramea*, *C. serrulata* y *C. spencei*).

La transferibilidad exitosa de los marcadores ISSRs permitió a Ely (2009) estudiar la diversidad genética de las 3 especies, pudiendo identificar polimorfismos al comparar los perfiles alélicos amplificados, e incluso pudo estimar índices de diversidad genéticos que le permitieron comparar la diversidad genética de las especies de bambúes del género *Chusquea* con relación a especies de otros géneros de bambúes. Basados en el estudio realizado por Ely (2009), se evaluó la capacidad de los marcadores de tipo ISSRs (una vez demostrada la buena transferibilidad, reproducibilidad y detección de polimorfismos a nivel inter- e intra-específico de 10 de los 12 marcadores empleados) para evaluar la variabilidad genética poblacional de la especie *C. guirigayensis* y distinguir entre ramets y genets en dicha población, basados en la comparación de los perfiles alélicos amplificados para cada individuo. Con dichos perfiles alélicos se calcularon los índices de H_{Tajima} ; H_{nei} haplotipos, H_e gen, G_{st} , H_s , H_T empleando los programas POPGEN32 y ARLEQUIN 3.5.

Otro de los programas comúnmente manejado para este tipo de análisis es el programa STRUCTURE; sin embargo, para el uso de este programa en los análisis moleculares la caracterización molecular debe realizarse con marcadores moleculares codominantes, lo que representa un problema con los ISSRs ya que la bibliografía no especifica claramente el tipo de marcadores que son. Empero, STRUCTURE analiza la presencia de estructura en las poblaciones, para lo cual se vale del índice F_{st} (recordando que dicho índice es la varianza genética total entre poblaciones, análogo al G_{st}); por lo que podríamos enfocarnos en el valor de G_{st} para realizar el diagnóstico para la población objeto de esta investigación. Basándonos en el valor de G_{st} obtenido para la población del *C. guirigayensis* (0,23), siguiendo los criterios del programa STRUCTURE, se deduce que se trata de una única población sin estructura (Pritchard *et al.* 2000; Attigala *et al.* 2015; Nilkanta *et al.* 2017; Amom *et al.* 2018).

Los resultados de este estudio confirman la transferibilidad de 10 de los 12 marcadores ISSRs evaluados (Tablas 8 y 9) (UBC810 UBC853, UBC864 y UBC873 ISSR-23, M13, ISSR-2, ISSR-3, ISSR-33 y ISSR-35), lo que podría sugerir su empleo para el estudio de otras poblaciones de diferentes especies de bambúes americanos. Sin embargo, con el objetivo de determinar el nivel de heterocigocidad e identificar de manera precisa la variabilidad genética de los alelos recesivos en las poblaciones de *Chusquea*, sería necesario desarrollar marcadores de tipo SSRs específicos para las especies de bambúes americanos.

7.3 Diversidad genética intra-poblacional de *C. guirigayensis*

En la presente investigación, al emplear tres niveles de muestreo diferentes, pudimos realizar la distinción entre ramets y genets, además de obtener una primera impresión del rango de cobertura de los ramets de un genet (la macolla). En el primer nivel de muestreo seguimos la metodología empleada por Ely (2009) y Fernández (2016) para intentar recolectar solo genets en la población, con lo cual obtuvimos un total de 18 genets diferentes, lo cual sugiere un muestreo exitoso para el diagnóstico de genets a nivel intra-poblacional, en vista de que fueron 22 muestras para dicho nivel. *C. guirigayensis* presenta rizomas paquimorfos, típicos de las especies de bambúes del subgénero *Swallenochloa* (Judziewicz *et al.* 1999), que difieren marcadamente de los rizomas leptomorfos de bambúes asiáticos arbustivos de ecosistemas montanos, que al ser elongados, favorecen el entrecruzamiento entre genets de una misma población (Lai y Hsiao 1997; Suyama *et al.* 2000; Kitamura y Kawahara, 2009; Matsuo *et al.* 2018), así como la extensión indefinida de los genets, pudiendo un solo genet constituir una población completa (Suyama *et al.* 2000; Saitoh *et al.* 2000; Isagi *et al.* 2004; Kitamura y Kawahara 2009).

Los escasos estudios poblacionales de bambúes asiáticos (Lai, y Hsiao 1997; Suyama *et al.* 2000; Kitamura y Kawahara 2009; Miyazaki *et al.* 2009; Mizuki *et al.* 2014) enfatizan la importancia de conocer la fisionomía, modo de propagación vegetativo y cobertura, aspectos que hasta la fecha no se han realizado en poblaciones de bambúes americanos. En plantas clonales, incluyendo bambúes se ha planteado la posibilidad de que las mutaciones somáticas contribuyan a la diversidad genotípica poblacional (Silvertown 2008; Kitamura y Kawahara 2009; Chen 2015; Yang 2016); sin embargo, este aporte no ha sido cuantificado, ni se ha demostrado su existencia demostrado con precisión en la actualidad.

Las poliploidías propias del grupo de Poaceae también contribuyen significativamente a la diversidad genética de bambúes; sin embargo, hasta la fecha, no se conoce con exactitud el número de cromosomas de *C. guirigayensis*, aunque Clark *et al.* (2015), establecen que el número de cromosomas para las especies de *Chusquea* en Venezuela está alrededor de 10.

Actualmente, la identificación de ramets en las poblaciones de plantas con reproducción asexual se detecta con base en la reducción en la diversidad de genotipos, ya que tanto los modelos teóricos como los datos experimentales muestran que la diversidad de genotipos se ve reducida por la propagación clonal; de hecho, algunas poblaciones clonales pueden tornarse monomórficas, en casos en los cuales llegase a ocurrir que toda la población surgiera de un limitado número de genets dominantes (Lai y Hsiao 1997; Suyama *et al.* 2000; Silvertown 2008; Kitamura y Kawahara 2009; Yang 2016).

Ellstrand y Roose (1987) propusieron un índice de diversidad genética para las plantas clonales que se fundamenta en la cantidad de genotipos encontrados en una población; dicho índice se denota con la ecuación G/N , donde G = número de clones (genotipos distintos) y N = tamaño de la muestra total (todos los individuos unidos fisiológicamente, ramets o genets), y toma valores entre 0 y 1. De esta manera si G/N tiende a 0, tendremos una población muy clonal, si por el contrario todos los genotipos son distintos ($G=N$), tendremos que G/N vale 1 si la población muestreada no es de origen clonal. Sin embargo, éste índice es susceptible a sobrestimación cuando se emplean marcadores moleculares dominantes o inespecíficos para la especie en estudio. Si aunado a ello se suma la falta de información en relación a la influencia de las mutaciones somáticas sobre la diversidad genética de la población, el resultado será una estimación poco representativa de la diversidad por el método G/N .

Existen otros índices empleados para la identificación de la clonalidad, como el índice de Identidad Genotípica (IG) o el índice de diversidad de Simpson (D), que se basan en la probabilidad de que individuos extraídos al azar de una población tengan el mismo genotipo; ambos índices son sensibles a la sobrestimación, ya que dependen del número de genotipos diferentes en la población (Eguiarte *et al.* 2007; Silvertown 2008).

Otro método de estimación capaz de sobrellevar los errores de sobreestimación, consiste en comparar los patrones de bandeo producto de amplificaciones por marcadores moleculares, empleando el índice de distancia genética de Nei-Li (1979) (S/G). Esta medida permite definir si cada par de individuos analizados tiene el mismo genotipo o si corresponden a un mismo genet, lo que puede determinarse con base en dos criterios, (1) que $S/G=1$ (todas las bandas son iguales entre los dos individuos) o (2) que $S/G= 0,88-1$ (entre 88% y 100% de las bandas son iguales). En nuestra investigación decidimos emplear este índice y seguir el segundo criterio con el fin de identificar los ramets en la población, dado que este último minimiza errores por sobre o subestimación de haplotipos, debido a relaciones de similitud o parentesco, mutaciones somáticas, e incluso errores producto de la endogamia (Eguiarte *et al.* 2007; Silvertown 2008; Kitamura y Kawahara 2009).

Para comparar los índices poblacionales obtenidos en nuestro estudio para *C. guirigayensis* con otros estudios utilizando marcadores ISSRs, se construyó la Tabla 11. En la misma se comparan los índices de diversidad genética de cuatro especies del género *Chusquea* venezolanas; dos trepadoras de bosques nublados andinos (*C. multiramea* y *C. serrulata*) del subgénero *Chusquea*, de floración típicamente gregaria, dos especies arbustivas de páramo (*C. guirigayensis* y *C. spencei*) del subgénero *Swallenochloa* y dos especies de bambúes asiáticos arborescentes de floración gregaria (*Dendrocalamus giganteus* y *D. membranaceus*) y un bambú arborescente de floración continua, anual asincrónica (*Guadua angustifolia*).

Los índices de *C. guirigayensis* varían entre 0,21 y 0,25 (H_e ; H_s , H_T), mientras que el índice de diversidad de Shannon (SI) un valor de 0,35 y el índice G/N de 1. Los valores de G/N correspondientes a las especies del género *Chusquea* se encuentran entre 1-0,89, lo que refleja una bajísima presencia de clones en las poblaciones; sólo en *C. serrulata* y *C. spencei* se detectaron 1 y 4 clones respectivamente (Ely 2009). Sin embargo, dado que los bambúes tienen una reproducción asexual continua, sería pertinente realizar investigaciones enfocadas en conocer la diversidad y cobertura de clones en las poblaciones de estas especies con marcadores moleculares.

En el caso de *C. guirigayensis*, a pesar de que el valor de $G/N=1$ (producto de que todos los genotipos de las muestras son diferentes), pudimos detectar, basados en la distancia de Nei-Li (1979), que de 33 muestras estudiadas, sólo 24 correspondían a diferentes, de lo que se infiere que este índice puede llevar a sobreestimaciones del número de genets diferentes en la población.

Los índices de *C. guirigayensis* son ligeramente más bajos que los reportados para las tres especies de *Chusquea* andinas (Tabla 11); solo el índice de diversidad genética poblacional (H_s) resultó ligeramente más alto con respecto a las otras especies señaladas en la Tabla 11, muy cercano al valor reportado por Ely *et al.* (2018) para *C. spencei*, posiblemente debido que ambas especies presentan floración continua y están asociados a ecosistemas de páramo, con la diferencia de que *C. spencei* presenta una distribución mucho más amplia en la región correspondiente a páramos de Venezuela y Colombia.

En cuanto al porcentaje de loci polimórficos ($\% P$), el índice de heterocigocidad esperada de Nei (H_e), el índice de Shannon (SI) y el índice de diversidad total (H_T), las especies de bosque nublado del género *Chusquea* (*C. multiramea* y *C. serrulata*) y la otra especie de páramo (*C. spencei*) presentan valores superiores a los de *C. guirigayensis*, reflejando una mayor diversidad genética. Estas diferencias probablemente se relacionan con el hecho de que las especies estudiadas por Ely *et al.* (2018) presentan una distribución más amplia en ecosistemas de alta montaña, lo cual le permitió estimar los índices de diversidad en función de varias poblaciones, mientras que los valores calculados para *C. guirigayensis* se estimaron para una sola población, en una sola localidad. No obstante, es importante señalar que todos los índices apuntan hacia una alta variabilidad genética para la especie, que se posiciona en el rango de especies de plantas que se reproducen de manera exclusivamente sexual, o con reproducción sexual y asexual continua (Silverton 2008).

Tabla 11. Comparación de los índices de diversidad de *C. guirigayensis* con otros estudios de bambúes leñosos en sus ambientes naturales obtenidos con estudios de marcadores ISSR.

Especies	<i>N</i>	<i>G</i>	<i>G/N</i>	<i>N_a</i>	% <i>P</i>	<i>H_e</i>	<i>SI</i>	<i>H_s</i>	<i>H_T</i>
<i>C. guirigayensis</i>	33	33	1	1,84	84,04	0,23	0,36	0,22	0,23
<i>C. multiramea</i>	37	37	1	2,0	100	0,41	0,60	0,17	0,42
<i>C. serrulata</i>	19	18	0,95	1,94	94,12	0,37	0,54	0,17	0,37
<i>C. spencei</i>	38	34	0,89	1,93	93,10	0,38	0,55	0,21	0,38
<i>D. giganteus</i>	108	na	na	na	88,57	0,04	0,06	0,43	0,3
<i>D. membranaceus</i>	240	na	na	na	99,00	0,22	0,35	0,16	Na
<i>G. angustifolia</i>	45	na	na	na	81,03	0,31	na	Na	Na

N: número de muestras; *G*: número de genotipos diferentes; *G/N*: número de genotipos dividido entre el número de muestras; *N_a*: número de alelos efectivos; %*P*: porcentaje de loci polimórficos; *H_e*: heterocigocidad esperada de Nei; *SI*: diversidad genética de Shannon; *H_s*: diversidad genética de la población; *H_T*: diversidad genética total. na: no se calcularon estos valores Fuente Ely *et al.* (2018) en prensa.

Estudios con especies bambúes americanos, como *Guadua angustifolia* Kunth, también revelan un elevado porcentaje de loci polimórficos (81%) e índice *H_e* de 0,31, que indica una alta diversidad genética en la especie, según un estudio realizado por Rugeles-Silva *et al.* (2009) en 9 biotipos de *G. angustifolia* con 6 marcadores de tipo ISSR, en diferentes localidades del eje cafetero en Colombia (Tabla 11).

Los estudios de caracterización genética poblacional en bambúes asiáticos como *Dendrocalamus* y *Phyllostachys* empleando marcadores moleculares, reportan una diversidad genética más baja que la de las especies de bambúes americanos de los géneros *Chusquea* (Ely 2009, Fernández 2016; Ely *et al.* 2018) y *Guadua* (Marulanda *et al.* 2002; Rugeles-Silva 2009). En la tabla 11 se hace referencia a un estudio con 12 poblaciones de *Dendrocalamus membranaceus* (Yang *et al.* 2012), donde se obtuvo un índice de diversidad de Shannon (*SI*) de 0,35, con un índice de diversidad *H_e* de 0,22, que indica una diversidad genética inferior, si se compara con *C. guirigayensis*, basada en una sola población.

El tipo de rizoma influye marcadamente en el modo de propagación asexual de plantas clonales; los bambúes leñosos arbustivos del sotobosque de bosques montanos caducifolios de Japón como *Sasa sananensis* Franch & Sav se propagan por rizomas leptomorfos (Suyama *et al.* 2000), a diferencia de los bambúes arbustivos de páramos andinos antes mencionados (Ely *et al.* 2018). El tipo de propagación clonal por rizomas puede influir en la diversidad de genets por población en ecosistemas naturales, como demostró un estudio realizado por Suyama *et al.* (2000) en una población *Sasa sananensis* utilizando marcadores AFLP, que reveló un bajo nivel de polimorfismo en la población, por el hecho de que una población de 1 Km² estaba compuesta de únicamente de 22 clones, con un clon dominante que ocupaba aproximadamente 300 m, gracias a su amplia extensión por rizomas leptomorfos. Dichos

resultados contrastan marcadamente con los obtenidos en el presente estudio, en la población de *C. guirigayensis* de la localidad Piedras Blancas, donde en una distancia de una hectárea, 33 ramets diferentes correspondieron a 24 genets diferentes.

Otro estudio poblacional realizado en bambúes asiáticos por Attigala (2015) con marcadores de tipo SSR, reveló una alta variabilidad genética en seis poblaciones de *Kuruna debilis* Thwaites, con unos índices promedio de H_e intra-poblacionales que variaban entre 0,5 y 0,7 superiores a los estimados en *C. guirigayensis* (0,23), y atribuimos estas diferencias al hecho de que el estudio realizado por Attigala *et al.* (2015), pese a que dichos autores utilizaron un tamaño de muestra similar (N=8), el muestreo se realizó en función de seis localidades, mientras que en *C. guirigayensis* se centró en una única población que presumimos favorece el entrecruzamiento.

En nuestra investigación identificamos un total de 13 clones de las 33 muestras recolectadas basados en la distancia genética de Nei-Li (1979), teniendo en cuenta que en el segundo nivel de muestreo, se recolectaron 11 ramets diferentes en una “misma macolla” (macolla 17), de las cuales nueve resultaron pertenecer a tres genets diferentes y los otros dos a genets diferentes, al comparar los perfiles alélicos de estos nueve genets, sus haplotipos presentaban muy pocas variaciones (de uno o dos alelos para cada marcador), lo que sugiere, o bien una variación de origen somaclonal o el entrecruzamiento entre genets ya emparentados; de ser el último caso, estas pequeñas variaciones entre los perfiles alélicos de los clones aumentarían al evaluar las muestras con mayor cantidad de marcadores moleculares, demostrando que no son verdaderamente clones sino cruces entre individuos muy emparentados.

Las variaciones somaclonales reportadas en las investigaciones de bambúes son de máximo uno o dos alelos diferentes para los ramets de un mismo individuo, una vez se ha comprobado que son ramets del mismo genets al escavar la macolla y observar la conexión física entre estos ramets (Matsuo 2008; Silvertown 2008; Kitamura y Kawahara 2009). Para afirmar que las variaciones de los perfiles alélicos en los distintos clones se deben a variaciones somaclonales; también, es necesario evaluar las muestras con una mayor cantidad de marcadores; además, de desenterrar las raíces de lo que consideremos ramets de un mismo genets.

Las variaciones en los perfiles alélicos amplificados puede deberse también, a la especificidad de los ISSRs utilizados en nuestra investigación; ya que estos se diseñaron para especies de bambúes asiáticos y a diferencia de tres de ellos (M13, ISSR-2 e ISSR-3), no se habían utilizado con anterioridad en especies del género *Chusquea*. Todas las variaciones entre los perfiles alélicos de los clones se documentaron (Sección 6.6.3, Diversidad genética a nivel de coexistencia de ramets fértiles

senescentes y vegetativos en un mismo genet) y esperamos sirvan de referencia para futuras investigaciones con marcadores ISSR en especies del género *Chusquea*.

Kitamura y Kawahara (2009) utilizaron marcadores SSR en una población de 1600 m² de *Sasa cernua* en Japón, para determinar la diversidad de haplotipos en N=1267 e identificaron seis genets o clones y reportan una variación somaclonal en culmos vegetativos de la misma macolla, en cuatro de los genets, de ellos correspondientes a 2pb y otros dos a 4pb. Este estudio realizado por Kitamura y Kawahara (2009) confirma la tendencia observada por Matsuo *et al.* (2008), quienes demostraron que los grupos de clones que presentaban diferencias de 2 pb en estos loci de microsatélites, estaban conectados por el sistema de raíces, confirmando que estas variaciones se debían a las mutaciones somáticas.

En nuestro tercer nivel de muestreo buscamos explorar la coexistencia de culmos en floración senescentes y culmos en estado vegetativo en un mismo genet, en aras de comprobar si el mismo genet es capaz de participar en más de un ciclo de floración; es decir, si *C. guirigayensis* presenta floración policárpica, contrario a lo que se conoce de muchas de las especies pertenecientes al mismo subgénero, tales como *Chusquea culeou* E. Desvaux, *Chusquea andina* R. A. Phillippi, *Chusquea pinifolia* Nees, *Chusquea montana* R. A. Phillippi, de floración típicamente monocárpica (Pearson *et al.* 1994; Judziewicz *et al.* 1999; Safford 2001; Montti *et al.* 2011).

Para poder afirmar que el tipo de floración de una especie es de tipo policárpica o monocárpica, es necesario realizar una verificación con múltiples herramientas y una cantidad de réplicas representativas de genets diferentes presentes en una población, colectando muestras de macollas que presenten tanto culmos en floración como culmos vegetativos y verificando la unión física a través de los rizomas aunados al uso de marcadores moleculares (Kitamura y Kawahara 2007; Matsuo 2008; Montti *et al.* 2011; Ely *et al.* 2018; Matsuo *et al.* 2018). Asimismo, para caracterizar el tipo de floración de *C. guirigayensis* se debe realizar un seguimiento por un ciclo de floración completo a la población, realizando múltiples y consecutivas visitas a la población, durante períodos largos, como se puede apreciar en los estudios fenológicos realizados por Pearson *et al.* (1994), Kitamura y Kawahara (2008), Miyazaki *et al.* (2009), Montti *et al.* (2011), Guerreiro *et al.* (2013, 2014) y Matsuo *et al.* (2018).

Los géneros de bambúes asiáticos como *Phyllostachys* y *Sasa* de rizomas leptomorfo se caracterizan por el hecho de que un mismo genet puede distribuirse por grandes extensiones, inclusive hasta varios kilómetros, formando bosques cerrados de bambúes (Makita 1998; Judziewicz *et al.* 1999; Clark *et al.* 2015). En los bambúes del subgénero *Swallemochloa*, todos presentan rizomas de tipo paquimorfo, en general, este tipo de distribución típica de las plantas clonales, aparentemente hace más

fácil distinguir visualmente los genets que componen la población (Makita 1998; Judziewicz *et al.* 1999; Clark *et al.* 2015; Ely *et al.* 2018). Makita (1998) relaciona la propagación por rizomas de los bambúes con sus ciclos fenológicos, es decir, cuando un genet florece y muere, mejoran las condiciones de luz para las plántulas adyacentes a los grupos parentales, y el tamaño del genet influirá sobre la disponibilidad de luz y condiciones de desarrollo de las plántulas emergentes. En estas condiciones, la floración sincronizada favorece las condiciones para el futuro establecimiento de las plántulas, dada la limitada viabilidad de las semillas, por el hecho de que las macollas parentales limitan considerablemente la disponibilidad de recursos, particularmente la luz, para el desarrollo de las plántulas.

En el caso de los bambúes americanos de páramo, los representantes del subgénero *Swallenochloa* se caracterizan en líneas generales por sus genets discretos y generalmente bien espaciados, por lo que es de esperar que la distancia entre genets favorezca el establecimiento y posterior desarrollo de las plántulas (Ely *et al.* 2018). Sin embargo, en la población de *C. guirigayensis* Piedras Blancas, encontramos tanto genets bien distanciados como genets entremezclados en una misma macolla, como se demostró mediante el uso de marcadores moleculares ISSR. Esta distribución agregada de las macollas indica que existen individuos “nodrizas” cuya función es la de proteger las semillas durante su dispersión de las altas tasas de radiación típicas del ecosistema páramo altiandino de las temperaturas congelantes y de los depredadores, entre otros factores.

Apoyándonos en los resultados de este estudio, podríamos afirmar que la población de *Chusquea guirigayensis* del Páramo de Piedras Blancas (Estado Mérida), posee una variabilidad genética relativamente alta, probablemente a causa de su patrón de floración policárpico; caracterizado por ciclos de floración cortos o continuos, que contribuyen a la diversidad genética mediante la reproducción sexual, sin descartar la variabilidad somaclonal producto de la reproducción clonal o asexual, teniendo en cuenta que los individuos de la población poseen un alto nivel de parentesco entre ellos, producto del aislamiento geográfico en los Andes venezolanos.

8 Conclusiones

- La población de *Chusquea guirigayensis* en el páramo de Los Romeros-Sector Piedras Blancas (Mérida) mantiene una alta proporción de genets fértiles, indicando que la reproducción sexual ocurre de manera continua, asincrónica y presumiblemente en ciclos cortos.

- Los marcadores ISSR de *Phyllostachys pubescens*, *P. kwangsiensis*, *P. bambusoides* y *Dendrocalamus membranaceus* son efectivos para la detección de polimorfismos en las especies del género *Chusquea*, tanto a nivel inter- e intra-específico.
- La población de *Chusquea guirigayensis* en el páramo de Los Romeros-Sector Piedras Blancas (Mérida) posee una alta diversidad genética, en términos de diversidad de haplotipos, proporción de loci polimórficos e índices de diversidad genética utilizados.
- El aislamiento geográfico de la población de *Chusquea guirigayensis* del Páramo de Piedras Blancas, sector los Romeros impide el flujo de genes con la única otra población de la especie en el país, como se infiere de la marcada similitud de perfiles alélicos, que indican un alto nivel de parentesco entre los genets muestreados.

9 Recomendaciones

- Basándonos en los resultados del presente estudio, recomendamos continuar explorando la variabilidad genética poblacional de *Chusquea guirigayensis*, para lo cual es imprescindible estudiar la población ubicada en la localidad del Monumento Natural Guirigay-Teta De Niquitao (Edo. Trujillo), con el objeto de comparar la diversidad genética intra e interpoblacional de la especie y determinar si estas dos poblaciones están experimentando procesos de especiación.
- Realizar una caracterización de la especie, en términos de su estructura etaria, para determinar la proporción y sobrevivencia plántulas, juveniles y adultos pre y post reproductivos.
- Determinar la incidencia de flósculos fértiles que originen cariopsis y la viabilidad de estas últimas, teniendo en cuenta que, hasta la fecha, no se han hallado propágulos viables en los genets fértiles en repetidas visitas a la población estudiada.

10 Bibliografía

1. Akagi, H., Yokozeki, Y., Inagaki, A., Nakamura, A. y Fujimura, T. (1996). A codominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, Rf-1, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 39(6), 1205-1209.
2. Amom, T., Tikendra, L., Rahaman, H., Potshangbam, A. y Nongdam, P. (2018). Evaluation of genetic relationship between 15 bamboo species of North-East India based on ISSR marker analysis. *Molecular Biology Research Communications*, 7-15.
3. Annapurna, D., Muyeed, A. S. y Viswanath, S. (2015). Morphological and Genetic Diversity Analysis in a Germplasm Bank of *Dendrocalamus stocksii* Munro -Implications on Conservation. *International Journal of Molecular Ecology and Conservation*, 5.
4. Attigala, L., Gallaher, T., Nason, J. y Clark, L. G. (2015). Genetic diversity and population structure of the threatened temperate woody bamboo *Kuruna debilis* (Poaceae: Bambusoideae: Arundinarieae) from Sri Lanka based on microsatellite analysis. *Phylogenetics, systematics and evolution of the temperate woody bamboos with an emphasis on the Kuruna clade*, 1001, 187.
5. Azofeifa-Delgado, Á. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía mesoamericana*, 17, 221-242.
6. Burgess, M. D., Smith, K. W., Evans, K. L., Leech, D., Pearce-Higgins, J. W., Branston, C. J., Lewthwaite, K. (2018). Tritrophic phenological match–mismatch in space and time. *Nature ecology & evolution*, 2(6), 970.
7. Canavan, S., Richardson, D. M., Visser, V., Roux, J. J. L., Vorontsova, M. S. y Wilson, J. R. U. (2016). The global distribution of bamboos: assessing correlates of introduction and invasion. *AoB PLANTS*, 9. doi: 10.1093/aobpla/plw078
8. Chen, X.-s., Li, Y.-f., Xie, Y.-h., Deng, Z.-m., Li, X., Li, F. y Hou, Z.-y. (2015). Trade-off between allocation to reproductive ramets and rhizome buds in *Carex brevicuspis* populations along a small-scale elevational gradient. *Scientific reports*, 5, 12688.
9. Clark, L. G. (1986). *Systematics of Chusquea section Chusquea, section Swallenochloa, section Verticillatae, and section Serpentes (Poaceae: Bambusoideae)*. Iowa State University, Iowa.
10. Clark, L. G., Londoño, X. y Ruiz-Sanchez, E. (2015). Bamboo Taxonomy and Habitat. In W. a. K. M. Liese (Ed.), *Bamboo, The Plant and its Uses* (Vol. 10, pp. 1-30). Germany: Springer
11. Clark, L. G. y Pohl, R. (1992). New chromosome counts for *Chusquea* and *Aulonemia* (poaceae: Bambusoideae)1. *American Journal of Botany*, 79, 478-480.
12. Clark, L. G., Zhang, W. y Wendel, J. F. (1995). A phylogeny of the grass family (Poaceae) based on ndhF sequence data. *Systematic Botany*, 436-460.
13. Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(1 Suppl), 25-30.
14. Culley, T. M. y Wolfe, A. D. (2001). Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity*, 86(5), 545-556.
15. Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (2007). *Ecología molecular*. Universidad Nacional Autónoma de México: Instituto Nacional de Ecología.
16. Ellstrand, N. C., & Roose, M. L. (1987). Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*, 123-131.
17. Ely, F. (2009). *Respuesta ecofisiológica y diversidad genética de Chusquea (Bambusoideae, Poaceae) en la cordillera de Mérida*. (Doctorado), Universidad de los Andes Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes
18. Ely, F. y Clark, L. G. (2011). Géneros de bambúes leñosos (Poaceae: bambusoideae: arundinarieae, bambuseae) de Venezuela. *Acta Botanica Venezuelana*, 34, 79-104.
19. Ely, F., Kiyota, S. y Rada, F. (2014). Freezing avoidance in tropical Andean bamboos. *The Journal of the American Bamboo Society*.

20. Francisca Ely, Fermin Rada, Gustavo Fermin and Lynn G. Clark. 2018. Ecophysiology and genetic diversity in high altitude species of *Chusquea* Kunth (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) of the Venezuelan Andes. *Plant Ecology and Diversity* (accepted, in press).
21. Esselman, E., Jianqiang, L., Crawford, D., Windus, J. y Wolfe, A. (1999). Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology*, 8(3), 443-451.
22. Fernández, J., D. (2016). *Diversidad morfológica, anatómica y genética de Chusquea fendleri* Munro (Bambusoideae: Poaceae) en Venezuela. Universidad de los Andes Laboratorio de anatomía vegetal.
23. Ferreira, T. y Rasband, W. (2012). ImageJ user guide. ImageJ/Fiji, 1.
24. Fisher, A. E., Clark, L. G. y Kelchner, S. A. (2014). Molecular phylogeny estimation of the bamboo genus *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae: Bambuseae) and description of two new subgenera. *Systematic Botany*, 39(3), 829-844.
25. Fisher, A. E., Triplett, J. K., Ho, C.-S., Schiller, A. D., Oltrogge, K. A., Schroder, E. S., Clark, L. G. (2009). Paraphyly in the bamboo subtribe *Chusqueinae* (Poaceae: Bambusoideae) and a revised infrageneric classification for *Chusquea*. *Systematic Botany*, 34(4), 673-683.
26. GoogleInc. (2008). Moving on from Picasa. 16/3/2018
27. Green, J., Richards, M., Murton, F., Statham, H., & Hallowell, N. (1997). Family communication and genetic counseling: the case of hereditary breast and ovarian cancer. *Journal of Genetic Counseling*, 6(1), 45-60.
28. Guerreiro, C. y Agrasar, Z. E. R. d. (2013). Two new species of *Chusquea* (Poaceae, Bambuseae) from northwestern Argentina. *Systematic Botany*, 38(2), 390-397.
29. Guerreiro, C. (2014). Flowering cycles of woody bamboos native to southern South America. *J Plant Res*, 127(2), 307-313.
30. Hamrick, J. L., & Godt, M. W. (1990). Allozyme diversity in plant species. *Plant population genetics, breeding, and genetic resources.*, 43-63.
31. Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
32. Hodkinson, T. R., Chase, M. W., Lledó, D. M., Salamin, N., & Renvoize, S. A. (2002). Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum* and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid trnL intron and trnL-F intergenic spacers. *J Plant Res*, 115(5), 381-392.
33. Horn, S. P. y Clark, L. G. (1992). Pollen viability in *Chusquea subtessellata* (Poaceae: Bambusoideae). *Biotropica*, 24(4), 577-579.
34. Hsiao, J. Y. y Rieseberg, L. (1994). Population genetic structure of *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology*, 3(3), 201-208.
35. Hsiao, j. y., Wang, b. s. y Rieseberg, l. h. (1996). Microgeographic allozyme variation in Yushan cane (*Yushania niitakayamensis*; Poaceae). *Plant Species Biology*, 11(2-3), 207-212.
36. Insuasty, J. (2014). *Variación espacio-temporal de la estructura poblacional de Chusquea tessellata* Munro (Poaceae: Bambusoideae) a lo largo de un gradiente altitudinal en el Parque Nacional Natural Chingaza. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Ciencias, Área Curricular de Biología Bogotá-Colombia.
37. Isagi, Y., Shimada, K., Kushima, H., Tanaka, N., Nagao, A., Ishikawa, T., Watanabe, S. (2004). Clonal structure and flowering traits of a bamboo [*Phyllostachys pubescens* (Mazel) Ohwi] stand grown from a simultaneous flowering as revealed by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 13(7), 2017-2021.
38. Judziewicz, E. J., Clark, L. G., Londono, X. y Stern, M. J. (1999). *American bamboos* (1 ed.). Washintong y Londres: Smithsonian Institution Press.

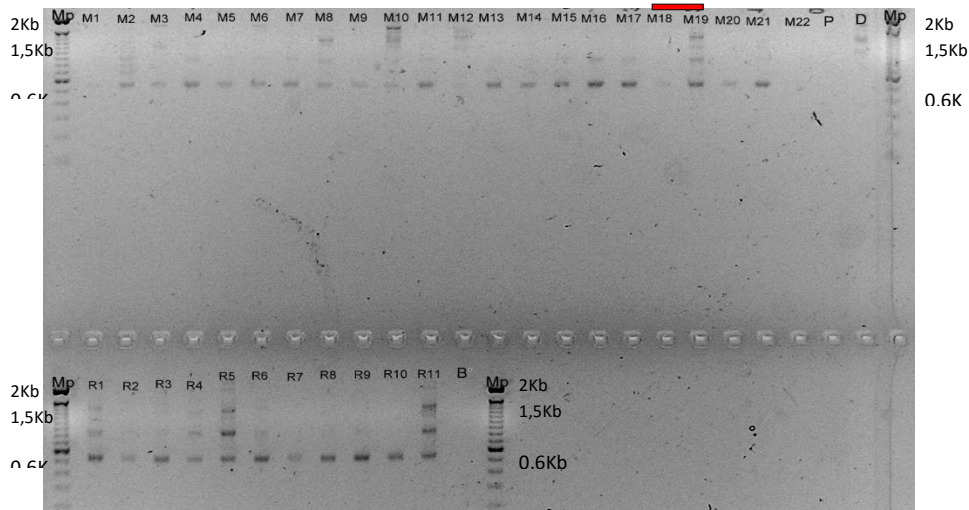
39. Kelchner, S. A. y Clark, L. G. (1997). Molecular Evolution and Phylogenetic Utility of the Chloroplast rpl16 Intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 8(3), 385-397.
40. Kelchner, S. A. (2013). Higher level phylogenetic relationships within the bamboos (Poaceae: Bambusoideae) based on five plastid markers. *Molecular phylogenetics and evolution*, 67(2), 404-413.
41. Kitamura, K. y Kawahara, T. (2009). Clonal identification by microsatellite loci in sporadic flowering of a dwarf bamboo species, *Sasa cernua*. *J Plant Res*, 122(3), 299-304. doi: 10.1007/s10265-009-0220-1
42. Kiyota, S. (2011). Estructura morfoanatómica y resistencia al congelamiento en bambúes de páramo del género *Chusquea* (Bambusoidea: Poaceae). *Trabajo especial de Grado de para optar al título de Licenciada en Biología. Facultad de Ciencias. Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela*.
43. Kuhn, R., Böllmann, J., Krahl, K., Bryant, I. M. y Martienssen, M. (2018). Data on DNA gel sample load, gel electrophoresis, PCR and cost analysis. *Data in brief*, 16, 732-751.
44. Kumar, S., Stecher, G. y Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
45. Lai, C. y Hsiao, J. (1997). Genetic variation of *Phyllostachys pubescens* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan based on DNA polymorphisms. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38.
46. Lalhruaitluanga, H. y Prasad, M. (2009). Comparative results of RAPD and ISSR markers for genetic diversity assessment in *Melocanna baccifera* Roxb. growing in Mizoram State of India. *African Journal of Biotechnology*, 8(22).
47. Li, A., & Ge, S. (2001). Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers. *Annals of Botany*, 87(5), 585-590.
48. Lin, S., Shao, L., Hui, C., Sandhu, H. S., Fan, T., Zhang, L., Shi, P. (2018). The effect of temperature on the developmental rates of seedling emergence and leaf-unfolding in two dwarf bamboo species. *Springer*. doi: 10.1007/s00468-018-1669-0
49. Lin, X. C., Lou, Y. F., Liu, J., Peng, J. S., Liao, G. L. y Fang, W. (2010). Crossbreeding of *Phyllostachys* species (Poaceae) and identification of their hybrids using ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*, 9(3), 1398-1404. doi: 10.4238/vol9-3gmr855
50. Londoño, X. (1990). Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). *Caldasia*, 16(77), 139-153.
51. MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1963). An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*, 17(4), 373-387
52. Makita, A. (1998). The significance of the mode of clonal growth in the life history of bamboos. *Plant Species Biology*, 13(2-3), 85-92.
53. Matsuo, A. (2008). Identified large genet of *Sasa kurilensis* by the DNA analysis. *Bamboo J*, 25, 64-73.
54. Matsuo, A., Tomimatsu, H., Sangetsu, Y., Suyama, Y. y Makita, A. (2018). Genet dynamics of a regenerating dwarf bamboo population across heterogeneous light environments in a temperate forest understorey. *Ecol Evol*, 8(3), 1746-1757. doi: 10.1002/ece3.3793
55. Miyazaki, Y., Ohnishi, Takafumi, H. y Hiura, T. (2009). Genets of dwarf bamboo do not die after one flowering event: evidence from genetic structure and flowering pattern. *J Plant Res*, 122(5), 523-528. doi: 10.1007/s10265-009-02419
56. Mizuki, I., Sato, A., Matsuo, A., Suyama, Y., Suzuki, J.-I. y Makita, A. (2014). Clonal structure, seed set, and self-pollination rate in mass-flowering bamboo species during off-year flowering events. *PloS one*, 9(8), e105051.
57. Monasterio, M. (1979). El Páramo desértico en el altiandino de Venezuela. *El medio ambiente Páramo*, 1, 17-145.

58. Montti, L., Campanello, P. I., Gatti, M. G., Blundo, C., Austin, A. T., Sala, O. E. y Goldstein, G. (2011). Understory bamboo flowering provides a very narrow light window of opportunity for canopy-tree recruitment in a neotropical forest of Misiones, Argentina. *Forest Ecology and Management*, 262(8), 1360-1369. doi: 10.1016/j.foreco.2011.06.029
59. Montti, L., Campanello, P. I., Gatti, M. G., Blundo, C., Austin, A. T., Sala, O. E., & Goldstein, G. (2011). Understory bamboo flowering provides a very narrow light window of opportunity for canopy-tree recruitment in a neotropical forest of Misiones, Argentina. *Forest Ecology and Management*, 262(8), 1360-1369. doi: 10.1016/j.foreco.2011.06.029
60. Nayak, S., Rout, G. y Das, P. (2003). Evaluation of the genetic variability in bamboo using RAPD markers. *Plant Soil and Environment*, 49(1), 24-28.
61. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323.
62. Nilkanta, H., Amom, T., Tikendra, L., Rahaman, H. y Nongdam, P. (2017). ISSR Marker Based Population Genetic Study of *Melocanna baccifera* (Roxb.) Kurz: A Commercially Important Bamboo of Manipur, North-East India. *Scientifica*, 2017.
63. Niño, M., Clark, L. G. y Dorr, L. J. (2006). Una nueva especie de *Chusquea* (Poaceae: Bambusoideae) de la Cordillera de Trujillo, Venezuela. *Brittonia*, 58(1), 46-51.
64. Patino, J., Whittaker, R. J., Borges, P. A., Fernández-Palacios, J. M., Ah-Peng, C., Araújo, M. B., Boer, E. J. (2017). A roadmap for island biology: 50 fundamental questions after 50 years of The Theory of Island Biogeography. *Journal of Biogeography*, 44(5), 963-983
65. Pearson, A. K., Pearson, O. P. y Gomez, I. A. (1994). Biology of the bamboo *Chusquea culeou* (Poaceae: Bambusoideae) in southern Argentina. *Vegetatio*, 111(2), 93-126.
66. Pérez-Galindo, P., Carlos-Andrés, C., González, G., Iván-Andrés, I. y Cárdenas, H. (2009). Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Ecology Resources*, 9(5), 1375-1379.
67. Pluess, A. R. y Stöcklin, J. (2004). Genetic diversity and fitness in *Scabiosa columbaria* in the Swiss Jura in relation to population size. *Conservation Genetics*, 5(2), 145-156.
68. Ramírez-Narváez, P. N. y Velasco-Linares, P. (2016). Características de la floración en poblaciones de *Chusquea scandens* Kunth-Bogota, D.C. (Colombia). *Caldasia*, 38(1), 137-147. doi: 10.15446/caldasia.v38n1.57834
69. Rugeles-Silva, P., A., Pso-Terranova, A., M., Londoño, X., Barrera-Marín, N. y Muñoz-Flórez, J., E. . (2012). Caracterización molecular de *Guadua angustifolia* Kunth mediante marcadores moleculares de tipo RAMS. *Acta Agronómica*, 61, 325-330.
70. Safford, H. D. (2001). Brazilian Páramos. III. Patterns and Rates of Postfire Regeneration in the Campos de Altitude 1. *Biotropica*, 33(2), 282-302.
71. Saito H, F. H., Kitamura K. (2000). Studies on isozyme variations and the retrogressive style in Tanzawa populations of Suzutake (*Sasa borealis*). *Bull Kanagawa Prefecture Forest Res*, 27, 1-14.
72. Sankar, A. A. y Moore, G. (2001). Evaluation of inter-simple sequence repeat analysis for mapping in *Citrus* and extension of the genetic linkage map. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2-3), 206-214.
73. Salazar, A., Sandoval, A. y Armendáriz, J. (2013). *Biología molecular, fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud*: Mexico DF: McGraw hill p.
74. Silvertown, J. (2008). The evolutionary maintenance of sexual reproduction: evidence from the ecological distribution of asexual reproduction in clonal plants. *International Journal of Plant Sciences*, 169(1), 157-168.
75. Soreng, R. J., Peterson, P. M., Romaschenko, K., Davidse, G., Teisher, J. K., Clark, L. G., Zuloaga, F. O. (2017). A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: An update and a comparison of two 2015 classifications. *Journal of Systematics and Evolution*, 55(4), 259-290. doi: 10.1111/jse.12262

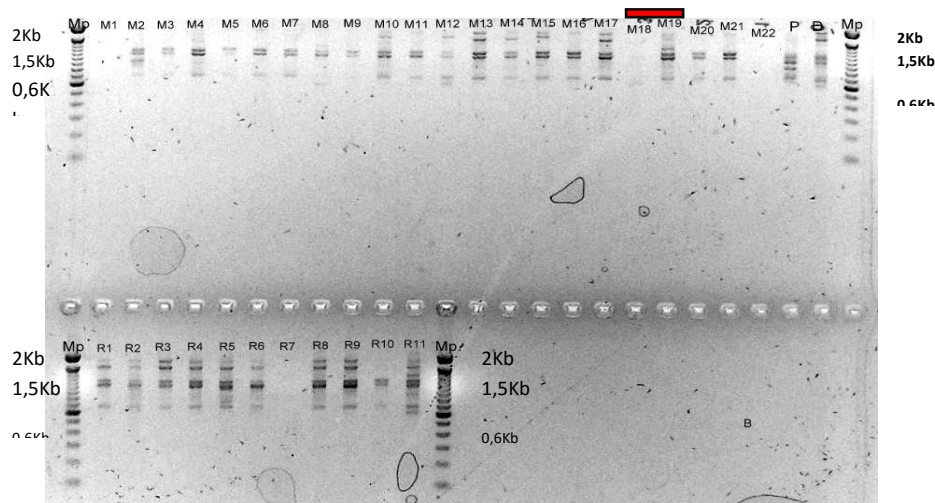
76. Suyama, Y., Obayashi, K. y Hayashi, I. (2000). Clonal structure in a dwarf bamboo (*Sasa senanensis*) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. *Molecular Ecology*, 9(7), 901-906.
77. Swofford, D. (2002). PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sunderland, MA: Sinauer Associates.
78. Tian, B., Yang, H.-Q., Wong, K.-M., Liu, A.-Z. y Ruan, Z.-Y. (2012). ISSR analysis shows low genetic diversity versus high genetic differentiation for giant bamboo, *Dendrocalamus giganteus* (Poaceae: Bambusoideae), in China populations. *Genetic resources and crop evolution*, 59(5), 901-908.
79. Vijayan, K. (2005). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. *Int. J. Indust. Entomol*, 10(2), 79-86.
80. Whittaker, R. J., Fernández-Palacios, J. M., Matthews, T. J., Borregaard, M. K., & Triantis, K. A. (2017). Island biogeography: Taking the long view of nature's laboratories. *Science*, 357(6354), eaam8326.
81. Widmer, E. (1999). *The Ecological role of bamboo (chusquea spp.) in the old-growth quercus forests of the cordillera de Talamanca, Costa Rica*. Swiss Federal Institute of Zechnology Zürich, Institute of Technology Zürich.
82. Wysocki, W. P., Clark, L. G., Attigala, L., Ruiz-Sanchez, E. y Duvall, M. R. (2015). Evolution of the bamboos (Bambusoideae; Poaceae): a full plastome phylogenomic analysis. *BMC evolutionary biology*, 15(1).
83. Xu, G., Su, W., Shu, Y., Cong, W., Wu, L., & Guo, C. (2012). RAPD and ISSR-assisted identification and development of three new SCAR markers specific for the *Thinopyrum elongatum* (Poaceae) genome. *Genetics and Molecular Research*, 11(2), 1741-1751.
84. Yang, H.-Q., An, M.-Y., Gu, Z.-J. y Tian, B. (2012). Genetic diversity and differentiation of *Dendrocalamus membranaceus* (Poaceae: Bambusoideae), a declining bamboo species in Yunnan, China, as based on inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *International journal of molecular sciences*, 13(4), 4446-4457.
85. Yang, Y. Y. y Kim, J. G. (2016). The optimal balance between sexual and asexual reproduction in variable environments: a systematic review. *Journal of Ecology and Environment*, 40(1), 12.
86. Yeasmin, L., Ali, M. N., Gantait, S. y Chakraborty, S. (2015). Bamboo: an overview on its genetic diversity and characterization. *3 Biotech*, 5(1), 1-11.
87. Zhao, H., Yang, L., Peng, Z., Sun, H., Yue, X., Lou, Y., Gao, Z. (2015). Developing genome-wide microsatellite markers of bamboo and their applications on molecular marker assisted taxonomy for accessions in the genus *Phyllostachys*. *Scientific reports*, 5, 8018.
88. Zietkiewicz, E., Rafalski, A. y Labuda, D. (1994). Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183.

11 Anexos

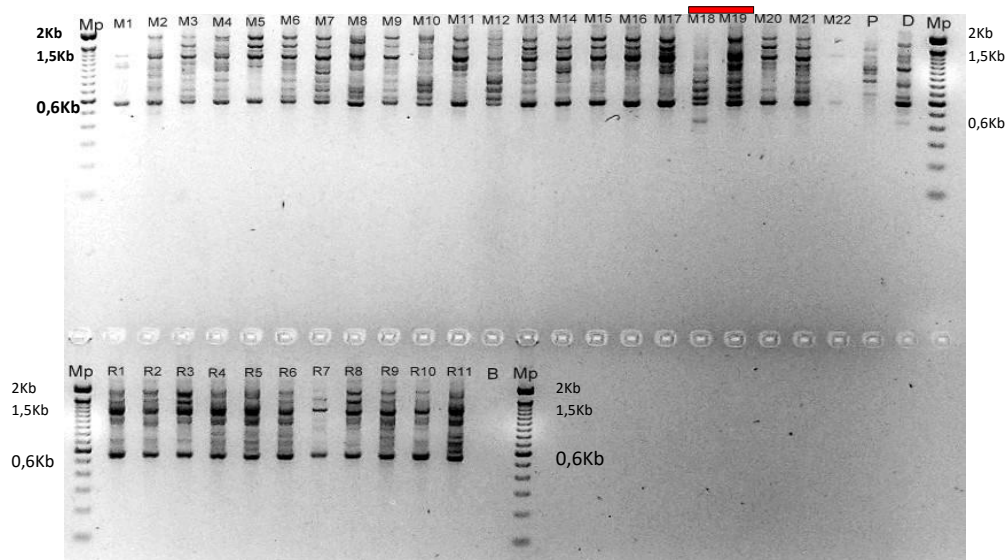
Los anexos 1-10 muestran las fotografías de los geles de agarosa con los resultados de las amplificaciones para cada uno de los marcadores ISSR utilizados para todos los niveles de estudio en *C. guirigayensis*. El anexo 11 presenta la fotografía del gel de agarosa con los productos amplificados con los marcadores ISSRs que fueron utilizados con la finalidad de determinar la capacidad de los ISSRs para separar diferentes especies del género *Chusquea* de acuerdo a su polimorfismo.



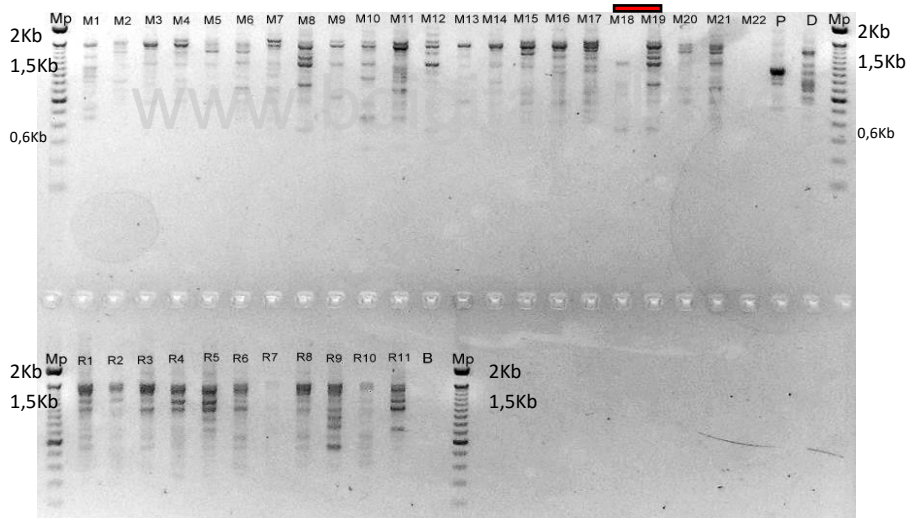
Anexo 1. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador UBC-810. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genotipo (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



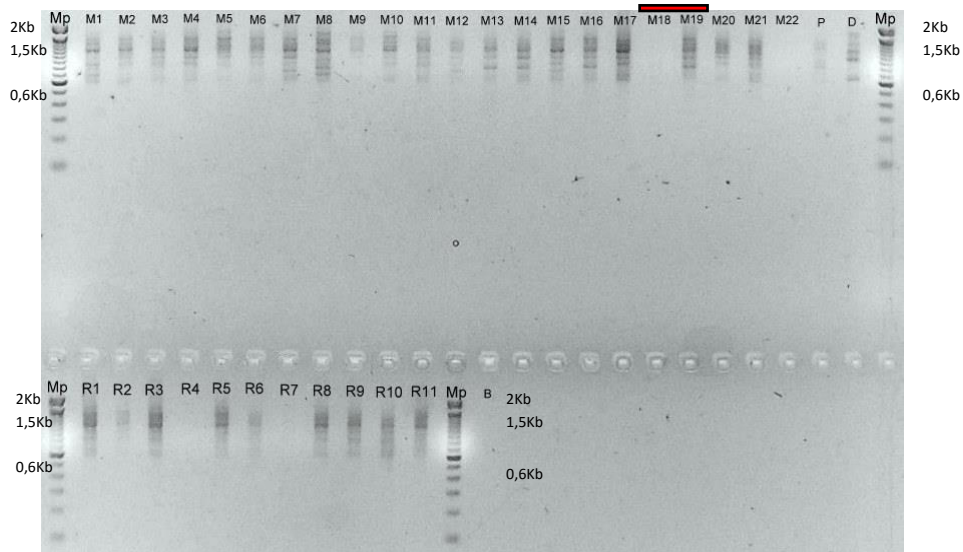
Anexo 2. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador UBC-853. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genotipo (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



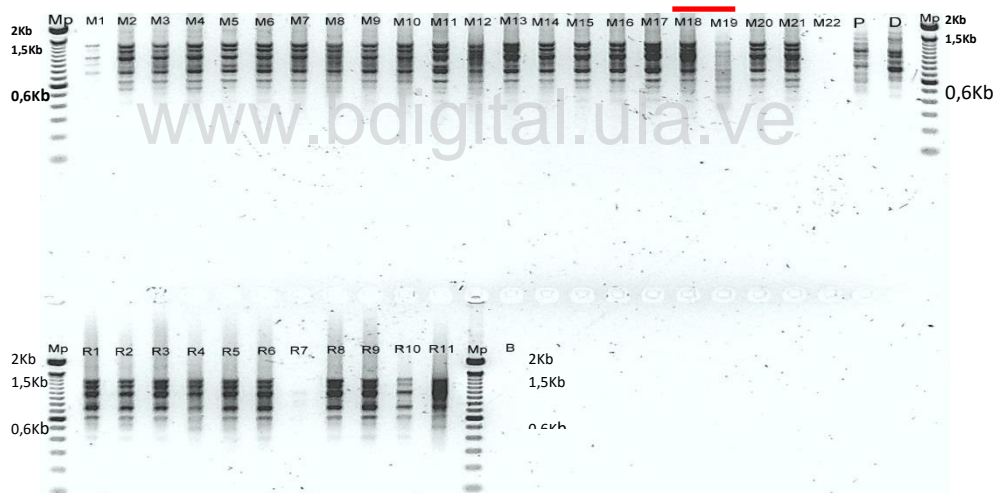
Anexo 3. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador UBC-864. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genotipo (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo



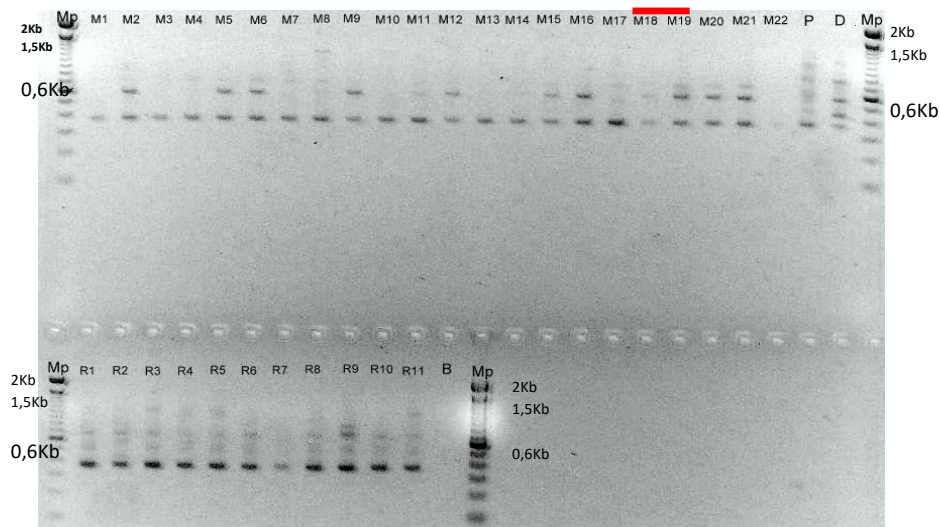
Anexo 4. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador UBC-873. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genotipo (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo



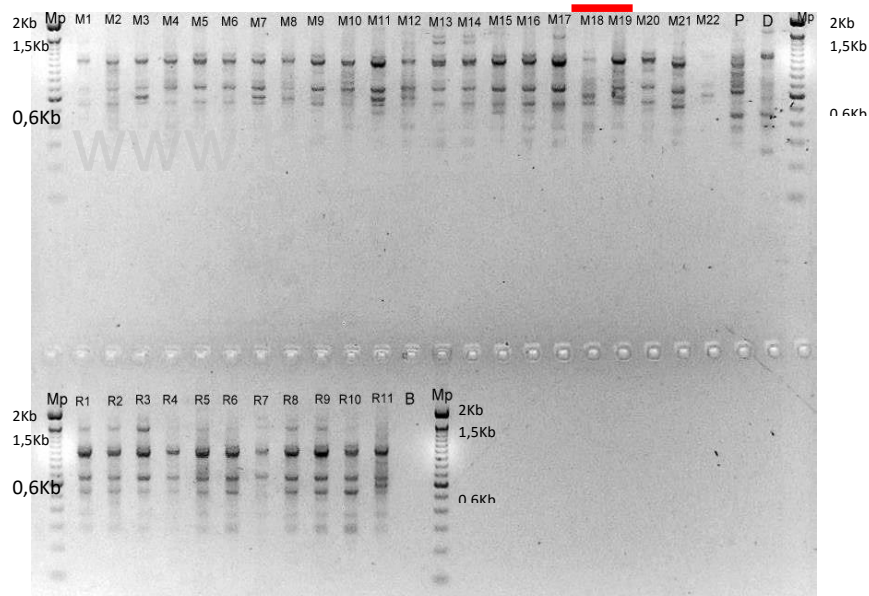
Anexo 5. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador ISSR-1. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo



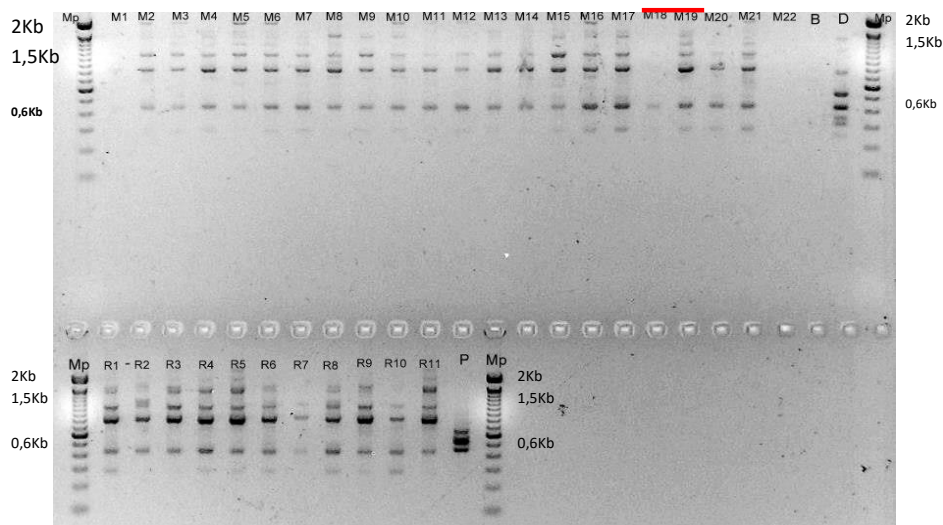
Anexo 6. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador ISSR-2. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



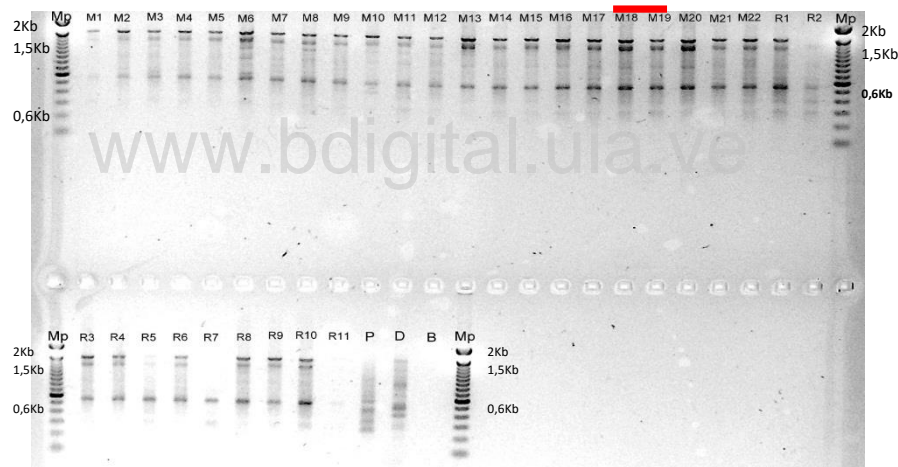
Anexo 7. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador ISSR-23. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



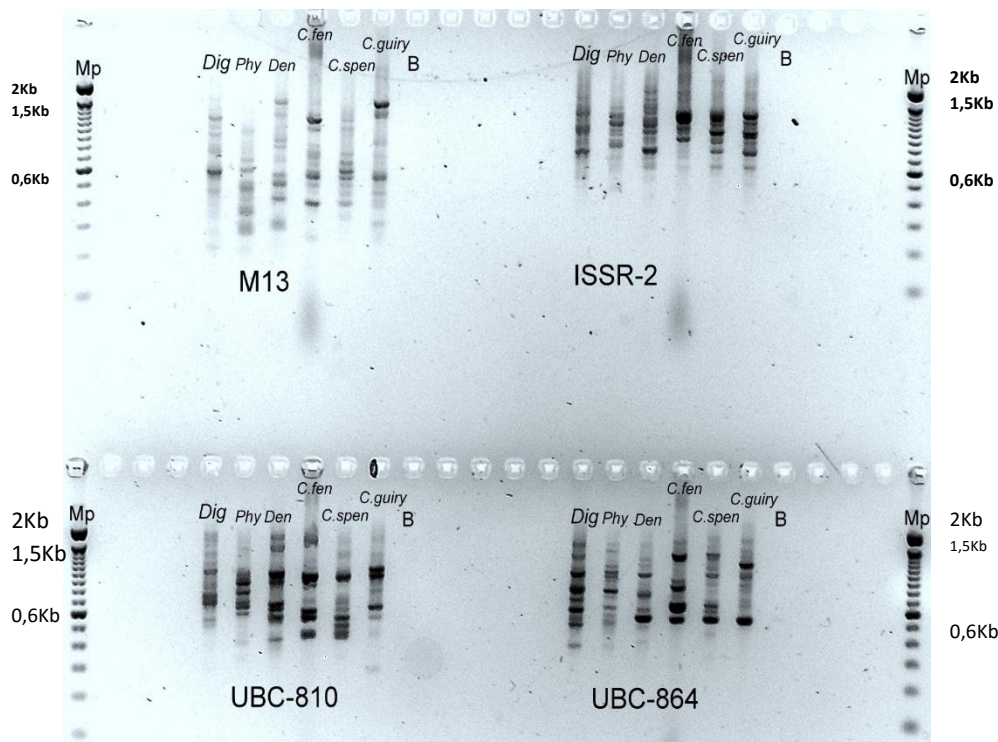
Anexo 8. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador ISSR-33. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



Anexo 9. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador ISSR-35. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



Anexo 10. Perfil alélico de *C. guirigayensis* obtenido a partir de la amplificación con el marcador M13. Controles positivos: (P) *Phyllostachys aurea*. (D) *Dendrocalamus asper*. (M) A nivel de población (R). A nivel de genet (misma macolla). (Mp) Marcador de peso molecular. (B) Blanco. Las muestras (M) representan los distintos individuos muestreados (nivel poblacional). Las muestras La línea roja sobre la muestra M18 y M19 muestra el tercer nivel evaluado (coexistencia de ramets fértiles y vegetativos en una misma macolla). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.



Anexo 11. Perfil alélico de las especies para determinar capacidad marcadores ISSR en la detección de segregación inter-especifica en diferentes especies de *Chusquea*. *Digitaria* (*Dig*), *Phyllostachys aurea* (*Phy*), (*Den*) *Dendrocalamus asper*, *C. fendleri* (*C. fen*), *C. spencei* (*C. spen*) y *C. guirigayensis* (*C. guiry*). Marcadores ISSRs: M13, ISSR-2, UBC-810 y UBC-864. Marcador de peso molecular (Mp). Blanco (B). Se cargaron 5µl de muestra/pozo.

Anexo 12. Matriz de distancia genética resultado de la utilización de POPGEN v1.31 con los datos de las muestras de *C. guirigayensis* y las demás especies evaluadas; datos utilizados para construir el dendrograma en la figura 20.

Especie	<i>Digitaria sp</i>	<i>Phyllostachys aurea</i>	<i>Dendrocalamus asper</i>	<i>C. fendleri</i>	<i>C. spencei</i>	<i>C. guirigayensis</i>
<i>Digitaria sp</i>	****	0.4795	0.4658	0.5068	0.5342	0.4658
<i>Phyllostachys aurea</i>	0.7351	****	0.5205	0.4521	0.5616	0.5479
<i>Dendrocalamus asper</i>	0.7641	0.6529	****	0.5205	0.5479	0.5342
<i>C. fendleri</i>	0.6795	0.7940	0.6529	****	0.6164	0.5753
<i>C. spencei</i>	0.6269	0.5769	0.6016	0.4838	****	0.6575
<i>C. guirigayensis</i>	0.7641	0.6016	0.6269	0.5528	0.4193	****

Anexo 13. Matriz de distancia genética resultado de la utilización de POPGEN v1.31 con los datos de las muestras de *C. guirigayensis* agrupando todos los niveles para construir la figura 21. En color amarillo se resaltan los índices de similitud de Nei (1979) con valores superiores a 0,9; con color naranja ladrillo los valores entre 0,88 y 0,90

Muestras	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
R1	****	0.8298	0.8830	0.8617	0.8830	0.8830	0.6809	0.8723	0.8617	0.8298	0.7447	0.6596	0.6915	0.8298	0.7979	0.7872	0.7660	0.7766
R2	0.1866	****	0.8404	0.8404	0.8617	0.8830	0.7660	0.8511	0.7979	0.8298	0.7021	0.7021	0.7766	0.8511	0.7766	0.8085	0.7447	0.7979
R3	0.1245	0.1738	****	0.8723	0.8298	0.8936	0.7340	0.9043	0.8511	0.8191	0.7553	0.7128	0.7234	0.8404	0.7660	0.8191	0.7766	0.8085
R4	0.1488	0.1738	0.1366	****	0.8511	0.8936	0.7766	0.8617	0.8298	0.8191	0.7766	0.6915	0.7447	0.8404	0.7872	0.7979	0.7766	0.8298
R5	0.1245	0.1488	0.1866	0.1613	****	0.8511	0.7128	0.8404	0.8085	0.7979	0.8404	0.6489	0.7021	0.8191	0.7447	0.7766	0.7766	0.8085
R6	0.1245	0.1245	0.1125	0.1125	0.1613	****	0.7766	0.8830	0.8723	0.9043	0.7340	0.7128	0.7660	0.8830	0.8085	0.8404	0.7979	0.8511
R7	0.3844	0.2666	0.3092	0.2528	0.3386	0.2528	****	0.7447	0.6702	0.7660	0.6596	0.7660	0.7128	0.7447	0.6702	0.7234	0.6596	0.7128
R8	0.1366	0.1613	0.1006	0.1488	0.1738	0.1245	0.2948	****	0.8617	0.7872	0.7234	0.7021	0.7128	0.8298	0.7766	0.7872	0.7447	0.7979
R9	0.1488	0.2258	0.1613	0.1866	0.2126	0.1366	0.4002	0.1488	****	0.8404	0.7553	0.6702	0.6809	0.7766	0.7447	0.7128	0.7128	0.7660
R10	0.1866	0.1866	0.1995	0.1995	0.2258	0.1006	0.2666	0.2392	0.1738	****	0.7021	0.6809	0.7766	0.8511	0.7553	0.8085	0.7872	0.8191
R11	0.2948	0.3536	0.2806	0.2528	0.1738	0.3092	0.4162	0.3238	0.2806	0.3536	****	0.5957	0.5851	0.7234	0.6702	0.6383	0.6596	0.7766
M1	0.4162	0.3536	0.3386	0.3689	0.4324	0.3386	0.2666	0.3536	0.4002	0.3844	0.5179	****	0.6915	0.6596	0.7128	0.6383	0.5957	0.6702
M2	0.3689	0.2528	0.3238	0.2948	0.3536	0.2666	0.3386	0.3386	0.3844	0.2528	0.5360	0.3689	****	0.7553	0.8298	0.8191	0.8191	0.7447
M3	0.1866	0.1613	0.1738	0.1738	0.1995	0.1245	0.2948	0.1866	0.2528	0.1613	0.3238	0.4162	0.2806	****	0.7979	0.8298	0.8298	0.8617
M4	0.2258	0.2528	0.2666	0.2392	0.2948	0.2126	0.4002	0.2528	0.2948	0.2806	0.4002	0.3386	0.1866	0.2258	****	0.7979	0.7979	0.8298
M5	0.2392	0.2126	0.1995	0.2258	0.2528	0.1738	0.3238	0.2392	0.3386	0.2126	0.4490	0.4490	0.1995	0.1866	0.2258	****	0.9149	0.7766
M6	0.2666	0.2948	0.2528	0.2528	0.2528	0.2258	0.4162	0.2948	0.3386	0.2392	0.4162	0.5179	0.1995	0.1866	0.2258	0.0889	****	0.7979
M7	0.2528	0.2258	0.2126	0.1866	0.2126	0.1613	0.3386	0.2258	0.2666	0.1995	0.2528	0.4002	0.2948	0.1488	0.1866	0.2528	0.2258	****
M8	0.2666	0.2392	0.2528	0.2528	0.2258	0.2528	0.4162	0.2948	0.3386	0.2666	0.3238	0.4162	0.3689	0.1866	0.3092	0.2666	0.2666	0.1738
M9	0.2258	0.2258	0.2126	0.1866	0.2666	0.1866	0.3386	0.2258	0.3238	0.2258	0.4002	0.3689	0.1613	0.1738	0.1613	0.1995	0.1995	0.1866
M10	0.2258	0.2258	0.2392	0.2126	0.2392	0.2392	0.4002	0.2528	0.3238	0.2806	0.3689	0.4002	0.2392	0.2528	0.2392	0.2528	0.2528	0.2392
M11	0.3689	0.2528	0.3536	0.2666	0.3844	0.2666	0.3386	0.3092	0.3536	0.2806	0.4658	0.4002	0.2948	0.2258	0.2392	0.2806	0.3092	0.1613
M12	0.3536	0.3238	0.2806	0.2806	0.3386	0.3386	0.3536	0.2666	0.4658	0.3536	0.3536	0.4829	0.3386	0.2392	0.3092	0.2666	0.2948	0.2258
M13	0.1488	0.2258	0.1125	0.2126	0.2126	0.1613	0.3386	0.0774	0.1866	0.2258	0.3092	0.4002	0.3238	0.1738	0.2126	0.2528	0.2528	0.2126
M14	0.1866	0.1613	0.1995	0.1995	0.1995	0.1738	0.3238	0.1613	0.2258	0.1866	0.3238	0.3536	0.2806	0.1613	0.1738	0.2392	0.2392	0.1488
M15	0.2258	0.2528	0.2392	0.2126	0.2126	0.2126	0.4002	0.1995	0.2392	0.2528	0.3386	0.4324	0.2392	0.2258	0.1866	0.2258	0.1995	0.1866
M16	0.1995	0.2806	0.2666	0.2392	0.2666	0.1866	0.3689	0.1995	0.2392	0.2258	0.4002	0.4002	0.2948	0.2258	0.2126	0.1995	0.2258	0.2126
M17	0.2258	0.2806	0.2126	0.2948	0.3238	0.2948	0.4658	0.1995	0.2392	0.3689	0.3689	0.4658	0.3844	0.2806	0.1866	0.3092	0.3689	0.2666
M18	0.3536	0.3238	0.3092	0.3092	0.3689	0.2806	0.2126	0.3238	0.4324	0.2666	0.4162	0.2948	0.3386	0.2666	0.3386	0.3238	0.3536	0.2806
M19	0.3386	0.3689	0.3536	0.3536	0.2948	0.3536	0.4658	0.3092	0.4162	0.3689	0.4002	0.5002	0.3536	0.3092	0.2948	0.3092	0.2806	0.3238
M20	0.2528	0.2528	0.2126	0.2666	0.2666	0.1613	0.2806	0.1995	0.3238	0.1738	0.4658	0.4002	0.2666	0.1488	0.2666	0.1738	0.2258	0.2392
M21	0.2666	0.3536	0.3092	0.3386	0.2806	0.3092	0.4490	0.2666	0.3689	0.2666	0.5179	0.4829	0.2806	0.2948	0.2806	0.2392	0.2126	0.3092
M22	0.3386	0.3092	0.2948	0.2392	0.3536	0.2392	0.1006	0.2528	0.3536	0.2528	0.4658	0.2806	0.3536	0.3092	0.3536	0.3092	0.3689	0.3238
P	0.5543	0.5179	0.5002	0.5360	0.4324	0.5360	0.4829	0.4490	0.6145	0.5179	0.5179	0.4829	0.5730	0.4490	0.5360	0.5921	0.5921	0.4324
D	0.6721	0.9598	0.7366	0.7821	0.9324	0.8797	0.8544	0.7591	0.7821	0.8544	0.7591	0.9057	0.9324	0.8544	0.8797	0.9057	0.9057	0.8297

M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	P	D
0.7660	0.7979	0.7979	0.6915	0.7021	0.8617	0.8298	0.7979	0.8191	0.7979	0.7021	0.7128	0.7766	0.7660	0.7128	0.5745	0.5106
0.7872	0.7979	0.7979	0.7766	0.7234	0.7979	0.8511	0.7766	0.7553	0.7553	0.7234	0.6915	0.7766	0.7021	0.7340	0.5957	0.3830
0.7766	0.8085	0.7872	0.7021	0.7553	0.8936	0.8191	0.7872	0.7660	0.8085	0.7340	0.7021	0.8085	0.7340	0.7447	0.6064	0.4787
0.7766	0.8298	0.8085	0.7660	0.7553	0.8085	0.8191	0.8085	0.7872	0.7447	0.7340	0.7021	0.7660	0.7128	0.7872	0.5851	0.4574
0.7979	0.7660	0.7872	0.6809	0.7128	0.8085	0.8191	0.8085	0.7660	0.7234	0.6915	0.7447	0.7660	0.7553	0.7021	0.6489	0.3936
0.7766	0.8298	0.7872	0.7660	0.7128	0.8511	0.8404	0.8085	0.8298	0.7447	0.7553	0.7021	0.8511	0.7340	0.7872	0.5851	0.4149
0.6596	0.7128	0.6702	0.7128	0.7021	0.7128	0.7234	0.6702	0.6915	0.6277	0.8085	0.6277	0.7553	0.6383	0.9043	0.6170	0.4255
0.7447	0.7979	0.7766	0.7340	0.7660	0.9255	0.8511	0.8191	0.8191	0.8191	0.7234	0.7340	0.8191	0.7660	0.7766	0.6383	0.4681
0.7128	0.7234	0.7234	0.7021	0.6277	0.8298	0.7979	0.7872	0.7872	0.7872	0.6489	0.6596	0.7234	0.6915	0.7021	0.5426	0.4574
0.7660	0.7979	0.7553	0.7553	0.7021	0.7979	0.8298	0.7766	0.7979	0.6915	0.7660	0.6915	0.8404	0.7660	0.7766	0.5957	0.4255
0.7234	0.6702	0.6915	0.6277	0.7021	0.7340	0.7234	0.7128	0.6702	0.6915	0.6596	0.6702	0.6277	0.5957	0.6277	0.5957	0.4681
0.6596	0.6915	0.6702	0.6702	0.6170	0.6702	0.7021	0.6489	0.6702	0.6277	0.7447	0.6064	0.6702	0.6170	0.7553	0.6170	0.4043
0.6915	0.8511	0.7872	0.7447	0.7128	0.7234	0.7553	0.7872	0.7447	0.6809	0.7128	0.7021	0.7660	0.7553	0.7021	0.5638	0.3936
0.8298	0.8404	0.7766	0.7979	0.7872	0.8404	0.8511	0.7979	0.7979	0.7553	0.7660	0.7340	0.8617	0.7447	0.7340	0.6383	0.4255
0.7340	0.8511	0.7872	0.7872	0.7340	0.8085	0.8404	0.8298	0.8085	0.8298	0.7128	0.7447	0.7660	0.7553	0.7021	0.5851	0.4149
0.7660	0.8191	0.7766	0.7553	0.7660	0.7766	0.7872	0.7979	0.8191	0.7340	0.7234	0.7340	0.8404	0.7872	0.7340	0.5532	0.4043
0.7660	0.8191	0.7766	0.7340	0.7447	0.7766	0.7872	0.8191	0.7979	0.6915	0.7021	0.7553	0.7979	0.8085	0.6915	0.5532	0.4043
0.8104	0.8298	0.7872	0.8511	0.7979	0.8085	0.8617	0.8298	0.8085	0.7660	0.7553	0.7234	0.7872	0.7340	0.7234	0.6489	0.4362
0.7766	0.7340	0.7340	0.7340	0.7234	0.7340	0.7660	0.8191	0.7340	0.7128	0.7234	0.7128	0.7553	0.7234	0.6489	0.5957	0.3830
0.2528	0.8723	0.8723	0.7872	0.7979	0.8085	0.8191	0.8511	0.8298	0.7660	0.7766	0.7447	0.8298	0.7553	0.7234	0.5638	0.4362
0.3092	0.1366	0.3092	0.7872	0.7553	0.7872	0.7979	0.7872	0.7660	0.7447	0.7340	0.7234	0.7447	0.7128	0.7021	0.5851	0.4362
0.3092	0.2392	0.2392	0.2806	0.2806	0.7234	0.8191	0.7234	0.7660	0.7660	0.7340	0.6809	0.7660	0.6702	0.7234	0.6277	0.4787
0.3238	0.2258	0.2806	0.2806	0.2806	0.7553	0.7234	0.7553	0.7340	0.7553	0.7660	0.7766	0.7979	0.7660	0.7340	0.6170	0.4894
0.3092	0.2126	0.2392	0.3238	0.2806	0.3092	0.9043	0.8085	0.7872	0.8298	0.7553	0.7447	0.8298	0.7766	0.7447	0.6277	0.4787
0.2666	0.1995	0.2258	0.1995	0.3238	0.1006	0.8404	0.8404	0.8191	0.8191	0.7660	0.7128	0.8191	0.7447	0.7553	0.6170	0.4468
0.1995	0.1613	0.2392	0.3238	0.2806	0.2126	0.1738	0.3092	0.8085	0.7872	0.6915	0.7447	0.8085	0.7979	0.7021	0.5638	0.4362
0.3092	0.1866	0.2666	0.2392	0.3092	0.2392	0.1995	0.2126	0.3092	0.8298	0.6915	0.7660	0.8511	0.8191	0.7234	0.5638	0.4787
0.3386	0.2666	0.2948	0.2666	0.2806	0.1866	0.1995	0.2392	0.1866	0.3092	0.6489	0.7447	0.7872	0.7340	0.6596	0.5000	0.5000
0.3238	0.2528	0.3092	0.3092	0.2666	0.2806	0.2666	0.3689	0.3689	0.4324	0.3386	0.7128	0.7553	0.6596	0.8404	0.6383	0.4681
0.3386	0.2948	0.3238	0.3844	0.2528	0.2948	0.3386	0.2948	0.2666	0.2948	0.3386	0.3386	0.8085	0.8617	0.6596	0.5426	0.3723
0.2806	0.1866	0.2948	0.2666	0.2258	0.1866	0.1995	0.2126	0.1613	0.2392	0.2806	0.2126	0.3092	0.8617	0.7660	0.6064	0.4574
0.3238	0.2806	0.3386	0.4002	0.2666	0.2528	0.2948	0.2258	0.1995	0.3092	0.4162	0.1488	0.1488	0.8617	0.6702	0.5745	0.4043
0.4324	0.3238	0.3536	0.3238	0.3092	0.2948	0.2806	0.3536	0.3238	0.4162	0.1738	0.4162	0.2666	0.4002	0.6702	0.5851	0.4787
0.5179	0.5730	0.5360	0.4658	0.4829	0.4658	0.4829	0.5730	0.5730	0.6931	0.4490	0.6115	0.5002	0.5543	0.5360	0.4468	0.4468
0.9598	0.8297	0.8297	0.7366	0.7147	0.7366	0.8056	0.8297	0.7366	0.6931	0.7591	0.9879	0.7821	0.9057	0.7366	0.8056	0.8056