

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Diversidad genética y conectividad del cedro (*Cedrela odorata*,
Meliaceae), árbol invasor en las Islas Galápagos**

Génesis Lizeth Vinueza Cuestas

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, 4 de mayo de 2020

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Diversidad y conectividad genética del cedro (*Cedrela odorata*, Meliaceae),
árbol invasor en las Islas Galápagos**

Génesis Lizeth Vinueza Cuestas

Nombre del profesor, Título académico

Gonzalo Rivas-Torres, Ph.D.

Quito, 4 de mayo de 2020

DERECHOS DE AUTOR

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

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

Nombres y apellidos: Génesis Lizeth Vinueza Cuestas

Código: 00123064

Cédula de identidad: 100401069-8

Lugar y fecha: Quito, 4 mayor de 2020

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

Resumen

El archipiélago de Galápagos es uno de los sitios de conservación más importantes del planeta. Sin embargo, su biota única se encuentra altamente amenazada por especies invasoras con alta capacidad de colonizar áreas grandes de esta zona protegida. Una de estas especies problemáticas, que impacta significativamente los ecosistemas nativos, es el árbol *Cedrela odorata* (Meliaceae), que por su utilidad maderable fue introducida en los años 40 en las islas. El objetivo de este estudio fue determinar la conectividad genética de poblaciones de *C. odorata* en las 4 islas que invade en Galápagos, con el fin de generar información base y específicamente entender cuál es su procedencia y cuántas veces ha sido introducida en este archipiélago. Por ello, se recolectaron hojas de 28 individuos de 4 islas: Floreana, Isabela, San Cristóbal y Santa Cruz, para posteriormente extraer ADN de las mismas por medio de un protocolo para muestras recalcitrantes basado en un buffer con alta concentración de sales. A partir del ADN extraído, se amplificaron mediante PCR, 4 regiones microsatélites (de 9 publicadas), que permitieron identificar un total de 26 alelos, con un promedio de 8 alelos por locus. La heterocigosidad global esperada fue de 0.278, reflejando que la diversidad genética de *C. odorata* en Galápagos es baja. Igualmente, se pudo determinar preliminarmente que hay un bajo grado de diferenciación genética entre las islas analizadas (considerando los valores F_{st} resultantes, que oscilaron entre -0.015 a 0.106). También, mediante el uso de un PCoA contrastando las mismas regiones microsatélites con poblaciones continentales, se determinó que es posible que *C. odorata* haya ingresado a Galápagos desde la región Costa del Ecuador. En conclusión, la diversidad genética de *C. odorata* en las islas Galápagos es baja de acuerdo con lo esperado para especies invasoras en islas, aparentemente su introducción es el producto de un solo evento de colonización, y asimismo su posible población de origen estaría ubicada en la región Costa del Ecuador continental. Estos resultados no solo proveen una línea base molecular para esta especie sino también datos importantes para el manejo de una de las plantas más invasoras en Galápagos.

Palabras clave: *Cedrela odorata*, conectividad, diversidad genética, F_{st} , Galápagos, islas, invasora, microsatélite, PCR, procedencia.

Abstract

The Galapagos archipelago is one of the most important conservation sites on the planet. However, the unique biota of this archipelago is highly threatened by invasive species with a high capacity to colonize large areas of this protected Park. One of these problematic species, which significantly impacts native ecosystems, is *Cedrela odorata* (Meliaceae), which due to its timber utility was introduced to the islands in the 1940s. The objective of this study was to determine the genetic connectivity of *C. odorata* populations in the 4 islands that it invades in the Galapagos, in order to generate baseline information and specifically understand the origin and how many times it has been introduced into this archipelago. Therefore, *C. odorata* fresh leaves were collected from 28 individuals located in 4 islands: Floreana, Isabela, San Cristóbal and Santa Cruz, to subsequently extract DNA using a recalcitrant DNA extraction protocol based on a buffer with a high salts concentration. From the extracted DNA, 4 microsatellite regions (out of 9 specific and published) were amplified by PCR, which allowed identify a total of 26 alleles, with an average of 8 alleles per locus. The expected global heterozygosity was 0.278, reflecting an apparent low genetic diversity of *C. odorata* in the Galapagos. Likewise, it was preliminarily determined there is a low degree of genetic differentiation between the analyzed islands (considering the resulting F_{st} values, which ranged from -0.015 to 0.106). Also, using a PCoA contrasting the same microsatellite regions with continental populations, it was determined that it is possible that *C. odorata* colonized Galapagos from the coastal region of Ecuador. In conclusion, the genetic diversity of *C. odorata* in the Galapagos is low as expected for invasive species on islands; its introduction apparently, is a product of a single colonization event; and the potential population of origin would be located in the coastal region of continental Ecuador. These results not only provide a molecular baseline for this species, but also important data for the management of one of the most invasive plants in the Galapagos.

Key words: *Cedrela odorata*, connectivity, genetic diversity, F_{st} , Galapagos, islands, invasive, microsatellite, PCR, provenance.

TABLA DE CONTENIDOS

1.	INTRODUCCIÓN	10
2.	MÉTODOS	13
2.1.	Sitio de Estudio	13
2.2.	Especie de estudio	13
2.3.	Recolección de muestras	14
2.4.	Métodos moleculares para obtención de parámetros de diversidad genética y conectividad de <i>C. odorata</i> en Galápagos	15
3.	RESULTADOS.....	17
3.1.	Optimización de protocolos de ADN y amplificación de loci microsatélites para <i>C. odorata</i>	17
3.2.	Diversidad genética y conectividad de <i>C. odorata</i> en las islas Galápagos	18
3.3.	Distribución, estructura y número de introducciones de <i>C. odorata</i>	19
4.	DISCUSIÓN	22
4.1.	Optimización de protocolos de ADN y amplificación de loci microsatélites para <i>C. odorata</i>	22
4.2.	Diversidad genética y conectividad de <i>C. odorata</i> en las islas Galápagos	23
4.3.	Distribución, estructura y número de introducciones de <i>C. odorata</i>	25
5.	CONCLUSIONES	27
6.	BIBLIOGRAFÍA	28
7.	ANEXOS	33

Anexo A. Mapa georreferenciado de individuos de <i>C. odorata</i> en las 4 islas donde se encuentra presente.....	33
Anexo B. Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido de muestras de <i>C. odorata</i> colectadas en Galápagos	34
Anexo C. Valores óptimos de K obtenidos en el programa STRUCTURE con datos de 28 individuos de las 4 islas analizadas.....	35
Anexo D. Análisis de coordenadas principales (PCoA) que compara la distancia genética entre muestras de las islas Galápagos con muestras del Ecuador continental	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Marcadores SSR reportados por Hernández et al. (2008) con sus respectivas condiciones de amplificación utilizadas en este estudio	17
Tabla 2. Resumen de análisis genéticos con 4 marcadores SSR para <i>C. odorata</i> en Galápagos	18
Tabla 3. Resumen de parámetros de diversidad genética para cada isla	19
Tabla 4. AMOVA para muestras de <i>C. odorata</i> de las 4 islas estudiadas	19
Tabla 5. Comparación de valores pairwise F_{ST} entre las cuatro islas donde se registra <i>C. odorata</i> en Galápagos	20

1. INTRODUCCIÓN

Las islas Galápagos son conocidas como uno de los sitios más importantes de conservación en el planeta (Charles Darwin Foundation, 2002; Guézou et al, 2010). A pesar de su importancia, la biota única registrada en este archipiélago icónico se ha visto significativamente impactada por varias especies invasoras que han sido introducidas a este sistema insular (Trueman, Standish, & Hobbs, 2014).

Las especies invasoras (plantas o animales) son aquellas que frecuentemente presentan una abundante descendencia fértil, al igual que una gran capacidad de dispersión; lo que les brinda un potencial para colonizar áreas extensas, generando impactos negativos en los ecosistemas locales (Martinez & Coquet, 2013). Según Gardener y colaboradores (2010), de las 880 especies de plantas que han sido introducidas a este archipiélago hasta el año de esta publicación, alrededor del 15% de las mismas fueron clasificadas como invasoras en esta área protegida (Gardener, Atkinson, & Renteria, 2010). Debido a que los ecosistemas insulares tienden a verse más afectados por invasiones biológicas, estas especies perjudiciales pueden ocasionar cambios significativos en la composición y estructura poblacional local (Urquia, 2019), amenazando no solo a las especies nativas coexistentes, sino también a los procesos únicos que se desarrollan en sistemas insulares como los de las Galápagos (Jäger, Kowarik, & Tye, 2009).

Dentro de las plantas invasoras registradas en Galápagos, *Cedrela odorata* ha sido identificada como uno de los árboles con mayor capacidad de expansión y a su vez de impacto negativo sobre la biota autóctona (Rivas, Benitez, Rueda, Sevilla, & Mena, 2018). A pesar de ello, no se conocen datos relevantes sobre su distribución hacia y dentro de las islas, información importante que serviría para delinear medidas de manejo apropiadas que permitan disminuir entre otras cosas, su capacidad invasora (Rivas, Benitez, Rueda, Sevilla, & Mena, 2018).

Estudios previos han permitido dilucidar que la mayor parte de plantas invasoras en las islas Galápagos se encuentran en lugares con un alto disturbio, como las áreas agrícolas o urbanas de estas islas (Rivas & Rivas, 2018). Sin embargo, no se conoce cómo estas especies se dispersan a otras islas y si estas nuevas colonizaciones tienen una sola población de origen o varios puntos de conexión. Para conocer cómo se dispersan las especies invasoras en sistemas insulares, el conocimiento de su estructura poblacional y su diversidad genética permite a su vez entender su origen, historial de introducción, número de invasiones y rutas de invasión (Urquia, 2019). Esta información es crucial para tomar medidas de manejo adecuadas para estas especies nocivas (Rivas & Rivas, 2018).

Para las islas Galápagos y las especies invasoras que se encuentran en este lugar, existen pocas herramientas moleculares desarrolladas y datos derivados de estas, que puedan ayudar a entender cuál es su origen y conectividad, información que además de aportar para tomar medidas para su control y manejo, pueden también contribuir con el conocimiento necesario para poner en práctica medidas de mitigación como el uso de biocontroles o enemigos naturales que se encuentran en la distribución nativa de estas especies perjudiciales (Carrión et al, 2014).

Para comprender el origen y movimiento de especies vegetales, y a la vez entender las diferencias genéticas existentes entre poblaciones estudiadas, se han desarrollado marcadores moleculares específicos y de gran utilidad para responder a estas necesidades de investigación. Dentro de los diferentes marcadores desarrollados al momento, existen los SSRs (Simple Sequence Repeats) que son secuencias de tipo satélite repetidas conocidas como microsatélites (Tautz, 1989). Los microsatélites han sido ampliamente utilizados en varios estudios a gran escala relacionados a genética de poblaciones y diversidad molecular, por su capacidad de ser altamente reproducibles, polimórficos y codominantes (Hosseinzadeh, Mohammad, Zahra, Mohadjerani, & Tafrihi, 2016). Cabe resaltar que estos marcadores moleculares han demostrado ser muy útiles en la detección del origen y para dilucidar los patrones de

colonización de especies invasoras en otros sistemas similares a Galápagos (Kueffer et al, 2009) y otras partes del mundo (Soldati, Inza, Fornes, & Zelener, 2014).

Por ello, el presente estudio tiene como objetivo general determinar la diversidad genética y conectividad de poblaciones de *C. odorata* en las islas Galápagos mediante métodos moleculares existentes. Específicamente, se buscó: primero, optimizar protocolos de extracción de ADN a partir de muestras de hojas de las islas Galápagos (colectadas de acuerdo a los rangos de distribución de esta especie en las 4 islas donde se registra), para paralelamente utilizar 4 marcadores moleculares microsatélites marcados con fluoróforos desarrollados específicamente para *C. odorata* (de 9 marcadores microsatélites publicados para esta especie (Hernandez, Macedo, Nuñez, Sanchez, & Aguila, 2018)); segundo, con los productos obtenidos se buscó realizar un análisis para comprender la diversidad genética y conectividad entre distintas poblaciones de *C. odorata* en las islas Galápagos; y tercero, determinar si *C. odorata* fue introducida a las islas varias veces y de varios sitios del Ecuador Continental. Finalmente, se espera que la información aquí presentada contribuya a la aplicación de medidas de manejo adecuadas para la especie en estudio dentro de las islas Galápagos.

2. MÉTODOS

2.1. Sitio de Estudio

El Archipiélago de Galápagos se encuentra ubicado a 1000 km al oeste de la Costa del Ecuador continental. Este archipiélago comprende un área aproximada de 798,500 hectáreas; la misma que se encuentra distribuida en 13 islas grandes, 4 de ellas habitadas (Isabela, Santa Cruz, San Cristóbal y Floreana) (Anexo A), 5 islas medianas y 216 islotes pequeños (Dirección del Parque Nacional Galápagos, 2014). Estas islas registran ecosistemas y microambientes que varían con relación a factores como la humedad, radiación solar, precipitación; y están correlacionados a la diferencia altitudinal de cada isla, por ejemplo, las zonas altas de las islas son generalmente más húmedas y frías que las zonas cerca de las costas (Dirección del Parque Nacional Galápagos, 2014). El área protegida del Parque Nacional Galápagos (PNG) abarca 771,600.81 o el 96.77% de la superficie terrestre insular de este archipiélago, el 3% restante corresponde a los asentamientos humanos, áreas agrícolas y ganaderas que no son consideradas como parte del área protegida (Rivas y Rivas, 2018). La mayoría de los individuos de la especie en estudio recolectados para esta investigación, provienen del área no protegida de las islas Galápagos.

2.2. Especie de estudio

C. odorata es una de las especies de cedros perteneciente a la familia Meliaceae, que se localiza en ambientes tropicales y subtropicales desde México hasta el norte de Argentina (Hernandez, Macedo, Nuñez, Sanchez, & Aguila, 2018). Por sus características, *C. odorata* es muy apreciada en la industria maderera por su buena calidad y su elevado costo en el mercado (Arnaez & Flores, 1988), por ello es también categorizada como una especie CITES o protegida para su comercialización (Mark & Rivers, 2017).

Sin embargo, *C. odorata* en las islas Galápagos es considerada como una planta invasora que presenta una amplia distribución e impacta negativamente la composición de

comunidades nativas (Rivas & Rivas, 2018). Registros históricos muestran que su posible introducción data de los años 40 para Santa Cruz, isla en donde se registra la mayor población de la especie, que se extiende especialmente en la frontera agrícola de esta (Renteria & Buddenhagen, 2006).

Por otro lado, estudios para *C. odorata* en el Ecuador Continental confirman que esta especie está registrada en la Costa, Sierra y Amazonía, reflejando una diversidad genética relativamente alta respecto a su heterocigosidad global esperada (0.814) (Asadobay, 2019). Un análisis de flujo génico para esta especie realizado de manera comparativa entre estas regiones del Ecuador continental permitió evaluar que existiría una menor variabilidad poblacional a nivel molecular entre la Costa y la Amazonía, mientras que la región Sierra se la identificó como un grupo separado de estas (Asadobay, 2019).

2.3.Recolección de muestras

Considerando la variabilidad de climas dentro de cada isla, los rangos de expansión de *C. odorata* en las mismas y el hecho que individuos de esta especie estarían colonizando ecosistemas secos/costeros de las zonas bajas (Rivas, Benitez, Rueda , Sevilla, & Mena, 2018), en los meses de febrero y marzo del año 2018 se realizó la colección de muestras de hojas jóvenes de *C. odorata* en las islas Santa Cruz, San Cristóbal, Isabela y Floreana, donde se registra su presencia. La colección de los individuos por isla se realizó considerando los rangos altitudinales y de distribución de esta especie (es decir, se colectaron individuos de las zonas altas y bajas de las islas y aquellos que están en los límites y centro de las zonas colonizadas). Se colectaron de 3 a 4 hojas jóvenes por árbol, las mismas que fueron almacenadas en fundas herméticas con sílica gel y rotuladas con su número y codificación basada en coordenadas obtenidas con GPS del lugar donde se localizaba cada individuo. Además, se colectó una muestra de rama por árbol para que sea registrada como voucher taxonómico de respaldo para esta investigación (mismas que reposan en el Herbario QUSF), en base a lo determinado en los

permisos PC-18-19 y MAE-DNB-2016-0041 correspondientes y expedidos por el Parque Nacional Galápagos y el Ministerio del Ambiente como autoridades competentes. Las muestras en sílica gel fueron llevadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito, donde se almacenaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.

2.4. Métodos moleculares para obtención de parámetros de diversidad genética y conectividad de *C. odorata* en Galápagos

Inicialmente se procedió con la extracción del material genético de las muestras utilizando el protocolo de Rezadoost *et al.* (2016), que fue modificado con el objetivo de mejorar la calidad del ADN genómico, disminuyendo la cantidad de material vegetal utilizado. La concentración de ADN fue verificada mediante el uso del equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 2009). Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del ADN. Las muestras extraídas se conservaron a -20°C.

Posteriormente, se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando marcadores microsatélites específicos. Los microsatélites, al ser secuencias repetidas en tándem, tienen la ventaja de ser altamente polimórficos y reproducibles permitiendo obtener altas tasas de mutación y un elevado número de alelos por lo que contribuyen significativamente para estudios poblacionales de diversidad, taxonomía, huellas genéticas, entre otros similares (Robledo & Gonzales, 2009). Por ello, en este estudio se utilizaron este tipo de primers específicos para *C. odorata*, reportados por Hernández *et al.* (2008), donde el primer *forward* estaba marcado con un fluoróforo. Estos microsatélites fueron previamente estandarizados utilizando diluciones de 100ng/μl de ADN. Para la elaboración del máster mix de cada una de las reacciones se agregó: 21.02 μl de agua PCR, 3 μl de buffer de PCR 10X (concentración final de 1X), 1.5 μl MgCl₂ 50 mM (concentración final de 2.5 mM), 0.6 μl de dNTPs 10mM (concentración final 0.2 mM), 0.6 μl de primer *forward* y *reverse* 10 μM (concentración final 0.2 μM), 0.48 μl de BSA 1mg/ml (Concentración final de 0.016 mg/ml),

0.2 μ l de Taq Polimerasa Platinum usando 1 U por reacción y 2 μ l de ADN diluido a 100ng/ μ l por muestra.

El programa de termociclado utilizado para la PCR fue el mismo publicado por Hernández *et al.* (2008), donde constan los siguientes pasos: 1) Denaturación inicial: 1 minuto a 94°C, 2) Denaturación: 1 minuto a 94°C, 3) Annealing: 1 minuto a 55°C, 4) Elongación: 1 minuto a 72°C y 5) Elongación final: 5 minutos a 72°C. El número de ciclos fue de 30 para cada primer utilizado. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1.5% durante 30 minutos a 100V.

Los productos de PCR fueron almacenados en refrigeración y posteriormente transferidos a placas MicroAMP Optical para su genotipado, después de haber sido enviados a la empresa Macrogen en Corea del Sur. Con los datos obtenidos del proceso de genotipado, se elaboró la matriz de alelos y se realizaron análisis en softwares como GeneMarker (SoftGenetics LLC, Versión 3.0.0) (GenMarker, 2018), RStudio (RStudio, versión 8.13, paquete estadístico adegenet) (RStudio, 2020) y STRUCTURE (Pritchard Lab, versión 2.3.4) (Pritchard, Wen, & Falush, 2010), para obtener cálculos (por isla y globales) de heterocigosidad esperada (H_e) y heterocigosidad observada (H_o), pairwise F_{st} , análisis de varianza molecular (AMOVA), análisis de coordenadas principales (PCoA) y de estructura poblacional considerando valores óptimos de K . Estos análisis, y de acuerdo con los objetivos de esta investigación, fueron comparados con muestras de un estudio paralelo realizado para el Ecuador continental (Asadobay, 2019), utilizando las mismas técnicas y protocolos mencionados en este estudio.

3. RESULTADOS

3.1. Optimización de protocolos de ADN y amplificación de loci microsatélites para

C. odorata

En relación al primer objetivo de este trabajo, se logró extraer exitosamente ADN de 28 muestras de individuos de *C. odorata* (de 40 individuos colectados – 10 por isla analizada), mediante un protocolo modificado para muestras recalcitrantes que igualmente permitió mejorar la calidad del ADN obtenido como también incrementar la concentración de el mismo en cada muestra (Hosseini, Kordrostami, & Hassani, 2016). La concentración de ADN cuantificada por el NanoDrop 2000 se estableció entre valores de 211,4 ng/μl a 1462,9 ng/μl, con una absorbancia en la relación 260/280 cercana a 2 y para el rango 260/230 con valores cercanos a 1.5 en promedio (es decir los valores considerados para pureza y calidad moderada (Lucena et al, 2016)). En la electroforesis por gel de agarosa se visualizó la presencia de bandas de ADN genómico que presentaron un alto peso molecular, lo que garantizó la aplicación del protocolo descrito y previamente modificado para esta especie. Al mismo tiempo, la metodología de PCR generada para esta investigación fue exitosa para las 28 muestras analizadas con la utilización de 4 primers específicos para *C. odorata* (Tabla1), donde la eficiencia del genotipado presentó un porcentaje del 87.5% de las reacciones de PCR.

Tabla 1. Marcadores SSR reportados por Hernández *et al.* (2008) con sus condiciones de amplificación utilizadas en este estudio

Primer	Fluoróforo	Temperatura de Annealing (°C)	Ciclos del termociclador	Tamaños de alelos (pb)
Ced131	6FAM	55	30	76-106
Ced18	VIC	55	30	118-152
Ced2	PET	55	30	123-175
Ced65	NED	55	30	162-188

3.2. Diversidad genética y conectividad de *C. odorata* en las islas Galápagos

En referencia al segundo objetivo de esta investigación, se puede concluir que los 4 loci microsatélites amplificados mediante PCR fueron polimórficos, generando un total de 8 alelos, en un rango de 1 a 3 alelos con un promedio de 2 alelos por locus. El microsatélite más informativo fue Ced2 con 3 alelos y el menos informativo fue Ced131 con solo 1 alelo (Tabla 2).

Tabla 2. Resumen de análisis genéticos con 4 marcadores SSR para *C. odorata* en Galápagos

Locus	Na	Ho	He
Ced131	1	0	0
Ced18	2	0	0.31
Ced2	3	0.13	0.43
Ced65	2	0.32	0.38

Nota. Na: número de alelos por locus; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada.

Además, los valores calculados de heterocigosidad esperada (He) por locus presentaron una variación fluctuante entre 0 a 0.43 con un promedio de 0.28, mientras que los valores para la heterocigosidad observada (Ho) por locus se establecieron entre 0 y 0.32 con un promedio de 0.11 (Tabla 2). Con respecto al número de alelos por región, San Cristóbal presentó un mayor número de alelos respecto a las demás islas (N=10), seguido por Floreana (N=9) e Isabela con 7 alelos. En cuanto a los alelos privados, se observa solamente la presencia de 1 alelo exclusivo para la isla San Cristóbal (Tabla 3).

Por otro lado, se pudo calcular que la heterocigosidad esperada He por isla, fluctuó entre 0.241 para Floreana (valor más bajo) y 0.264 para Isabela (valor más alto). Por otra parte, la heterocigosidad observada por isla se registró entre los valores de 0.340 a 0.363, a excepción de la isla Santa Cruz donde no se obtuvo ningún valor de Ho (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de parámetros de diversidad genética para cada isla

Isla	N	Na	NaR	Npa	NpaR	Ho	He
Floreana	9	7	7	0	0	0.340	0.241
Isabela	7	7	7	0	0	0.363	0.264
San Cristóbal	10	8	8	1	1	0.350	0.246
Santa Cruz	2	4	4	0	0	NaN	0.343

Nota. N: número de individuos analizados por isla; Na: número de alelos por isla; NaR: número de alelos por isla con rarefacción (compensación de disparidad en el tamaño de las muestras de cada población (Urquia, 2019)); Npa: número de alelos privados por isla; NpaR: número de alelos privados por isla con rarefacción; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

3.3. Distribución, estructura y número de introducciones de *C. odorata*

Para responder al tercer objetivo de esta investigación, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), mismo que permitió determinar la existencia de un 35% de variabilidad a nivel de individuos, un 60% entre poblaciones y un 5% dentro de las poblaciones analizadas de *C. odorata* en Galápagos. Los porcentajes fueron significativos para las fuentes de variación dentro de los individuos y entre poblaciones, mientras que para la fuente de variación dentro de las poblaciones no se registró significancia estadística (Tabla 4).

Tabla 4. AMOVA para muestras de *C. odorata* de las 4 islas estudiadas

Fuente de variación	p-value	Porcentaje
Dentro de los individuos	0.001	35%
Entre poblaciones	0.001	60%
Dentro de las poblaciones	0.220	5%

Así mismo, el resultado obtenido en base al análisis de coordenadas principales (PCoA) (intervalo de confianza del 95%), que busca medir la distancia genética entre las 4 islas

analizadas, permitió evidenciar la presencia de un solo posible clúster para las mismas, debido a que los individuos en la presentación gráfica de este análisis discriminante tienden a agruparse en un solo lugar (Anexo B).

Comparando los valores de PCoA con los del pairwise Fst, se confirma que no existe una gran diferenciación genética entre cada isla estudiada, ya que la mayoría de los valores resultantes son muy bajos (siendo 0.106 el valor de pairwise Fst más alto registrado para las islas Floreana e Isabela) (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de valores pairwise FST entre las cuatro islas donde se registra *C. odorata* en Galápagos

	Floreana	Isabela	San Cristobal	Santa Cruz
Floreana	-	0.106	0.023	-0.062
Isabela	0.106	-	0.082	0.078
San Cristobal	0.023	0.082	-	-0.015
Santa Cruz	-0.062	0.078	-0.015	-

Para la determinación de la estructura genética poblacional (realizada por el programa STRUCTURE) de las 4 islas estudiadas, se evidenció que existe una tendencia similar a lo observado para los valores antes mencionados de PCoA y pairwise Fst, reportándose que el número más probable de linajes o grupos ancestrales (K) fue de 7 ($\Delta K=1.145556$), seguido por un K de 9 ($\Delta K=0.741227$), K de 5 ($\Delta K=0.713511$) y K de 6 ($\Delta K=0.591250$). En general para este análisis, no se distingue una estructura poblacional definida e individual para cada una de las 4 islas estudiadas (Anexo C).

Adicionalmente, el análisis paralelo de PCoA realizado para comparar a las muestras de *C. odorata* de las islas Galápagos con muestras de Ecuador continental (Anexo D), permitió

evidenciar preliminarmente que las muestras de Galápagos se encuentran más cercanas a las muestras de la región Costa del Ecuador (sus elipses o intervalos de confianza se sobrelapan), lo que permite asumir que las poblaciones de esta especie en Galápagos provienen de esta zona continental.

4. DISCUSIÓN

4.1. Optimización de protocolos de ADN y amplificación de loci microsatélites para

C. odorata

Este estudio inicialmente utilizó un protocolo de extracción de ADN usando la técnica de CTAB como lo sugieren estudios similares realizados previamente (Saghai-Marooof, Soliman, Jorgensen, & Allard, 1984). Sin embargo, este protocolo preliminar no fue tan eficiente debido a que el ADN resultante mostró gran cantidad de componentes fenólicos que reducían la calidad de esta molécula y por ende la amplificación de la misma era insatisfactoria. Para solucionar este inconveniente metodológico, se utilizó un protocolo de extracción de ADN para muestras recalcitrantes que, con ligeras modificaciones respecto a la cantidad de muestra utilizada y la adición de un buffer con alta concentración de sales, permitió mejorar significativamente la calidad del ADN extraído para la especie en estudio (Hossein, Kordrostami, & Hassani, 2016). Además, este protocolo para muestras recalcitrantes permitió que el ADN extraído de muestras “antiguas o viejas” tenga mejores rangos de calidad y concentración, permitiendo aprovechar de mejor manera la muestra de hoja utilizada (Moreira & Oliveira, 2011).

Asimismo, los valores resultantes para la absorbancia 260/280 (realizados utilizando el equipo NanoDrop 2000, y que permiten verificar índices de calidad e integridad del ADN extraído) fueron cercanos a 2, que son muy parecidos al valor referencial de 1.8 (Thermo Scientific, 2009), por lo que se puede considerar que hubo ausencia de compuestos fenólicos en las muestras de esta molécula que fueron cuantificadas (Thermo Scientific, 2009) y posteriormente utilizadas en los análisis moleculares descritos en la sección de Resultados. Mientras que para la relación de 260/230, los valores promedio fueron de 1.5 (considerando que los rangos reportados para la relación 260/230 son de 1.8 a 2.2) (Thermo Scientific, 2009), determinando que si existió presencia de componentes contaminantes en las muestras de ADN

entre los que podrían encontrarse sales, proteínas, carbohidratos, entre otros (Lucena et al, 2016). A pesar de ello, estos componentes no influyeron posteriormente en la obtención de los productos de la PCR.

Gracias al protocolo antes mencionado y al ADN extraído como resultado, la amplificación de los 4 primers usados en este estudio (Ced131, Ce18, Ced2, Ced65) (Hernandez, Macedo, Nuñez, Sanchez, & Aguila, 2018), fue exitosa, permitiendo estandarizar condiciones de ciclos, temperatura y BSA (Bovin Serum Albumin; importantes dentro del proceso de la PCR) muy similares para todos los marcadores microsatélites utilizados en esta investigación. Aparentemente el BSA contribuyó en gran medida a inhibir aquellos compuestos fenólicos que podrían causar efectos negativos en el proceso de amplificación aquí utilizado, como se reporta en otros estudios similares (Farell & Alexandre, 2012).

Asimismo, el número de ciclos estandarizados para este estudio permitió obtener bandas claras en el gel de agarosa y posteriormente buenos resultados en el genotipado de las muestras (Farell & Alexandre, 2012). Sin embargo, de las 28 muestras analizadas varias (14 muestras) no lograron ser amplificadas para cada uno de los primers, de acuerdo con lo evidenciado en el programa GeneMarker. Este inconveniente se podría explicar por el posible daño en el fluoróforo contenido en el producto de PCR al momento de su manipulación en el laboratorio, puesto que estos marcadores son sensibles a la luz (Applied biosystems, 2014).

4.2. Diversidad genética y conectividad de *C. odorata* en las islas Galápagos

Los 4 marcadores microsatélites usados en este estudio mostraron ser polimórficos (Tabla 2) por lo que existen varios alelos en un mismo locus y, por lo tanto, se obtiene más información de las muestras estudiadas. Sin embargo, contrario a lo reportado por Hernández y colaboradores en 2008 (quienes reportaron entre 14 y 30 alelos por locus para 487 muestras usando 9 primers para *C. odorata*), se puede discutir preliminarmente que los marcadores moleculares aquí utilizados no son tan informativos, ya que en total el mayor número de alelos

encontrados por locus fue de solamente 3. Este resultado puede explicarse debido a que la cantidad de marcadores usados en este estudio es muy baja en comparación con otros estudios poblacionales (donde se utilizan un mínimo de 7 marcadores microsatélites) (Mendez, Roman, Isea, Villasmil, & Jordana, 2005). Normalmente se espera que mientras más marcadores microsatélites se utilicen en un estudio, mayor será la sensibilidad de análisis respecto a las muestras utilizadas (Zhang & Hou, 2004), lo que puede influir significativamente en los parámetros moleculares a analizar (Zhang & Hou, 2004).

La heterocigosidad esperada global (H_e) para las 4 islas estudiadas fue de 0.278, permitiendo determinar preliminarmente que la diversidad genética de *C. odorata* en las islas Galápagos es baja en comparación a otros estudios realizados en esta misma especie (0.814 en el Ecuador continental (Asadobay, 2019)), y en otras especies invasoras (*Psidium guajava*: 0.444) registradas también en este sistema insular (Urquia, 2019)). Esta baja diversidad genética registrada en organismos invasores puede ser común en islas, debido a los cuellos de botella que se pueden generar en las poblaciones colonizadoras transportadas a estos territorios remotos, por lo que varios alelos no serían introducidos al nuevo rango (Stuessy, Takayama, Lopez, & Crawford, 2014), disminuyendo también la probabilidad de tener individuos heterocigotos (Piry, Luikart, & Cornuet, 1999).

La heterocigosidad observada global ($H_o=0.38$) fue mayor a la heterocigosidad esperada global ($H_e=0.278$) para las muestras de *C. odorata* analizadas. Estos valores muestran que no hay una desviación en el equilibrio Hardy-Weinberg y por ende existiría un bajo nivel de endogamia entre los individuos de *C. odorata* analizados (Ramirez, Hartley, Ortiz, Ulloa, & Nuñez, 2015). Esta observación puede explicarse por el hecho que *C. odorata* presenta una introducción relativamente recientemente a las islas Galápagos (~1940) (Renteria & Buddenhagen, 2006), por lo que posiblemente aún esta especie no lograría alcanzar un equilibrio de sus frecuencias genotípicas (Urquia, 2019). Igualmente se debe analizar si

posiblemente la endogamia (a pesar de ser baja) en esta especie, podría estar afectando indirectamente con el aumento en el número de homocigotos, lo que a su vez influiría en los procesos y equilibrios antes mencionados (Loeschcke, Volker, Tomiuk, & Jain, 2013).

Asimismo, los resultados de heterocigosidad observada por locus mostraron rangos entre 0 y 0.32, siendo el primero el valor más bajo. Este valor de 0 (calculado mediante el programa RStudio), podría explicarse por el hecho de que aparentemente hay un solo alelo para el primer Ced131 y 2 alelos para el primer Ced18, por lo que dichos marcadores microsatélites al ser monomórficos o muy poco polimórficos, ofrecen una limitada información sobre los individuos analizados (Martinez, Rodero, & Vega, 2000), misma que se reflejó en este resultado.

4.3. Distribución, estructura y número de introducciones de *C. odorata*

Se determinó inicialmente en base a los resultados obtenidos del análisis de varianza (AMOVA), que hay un buen porcentaje de variabilidad genética (60%) entre las poblaciones y no dentro de los individuos (5%). Por ende, para comprender la estructura poblacional de *C. odorata* en las islas Galápagos el diagrama PCoA elaborado a partir de las distancias genéticas de las muestras estudiadas, permite dilucidar preliminarmente que todos los individuos analizados pertenecen a un mismo grupo poblacional, lo que explica una moderada diferenciación genética entre cada isla, ya que existiría un bajo flujo génico entre las poblaciones de este árbol invasor estudiadas en el archipiélago (Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2015). Esto puede corroborarse con los resultados obtenidos del pairwise F_{st} para todas las combinaciones pareadas de las 4 islas en análisis, mismos que en general presentan valores menores a 0.1, lo que se puede interpretar como una baja diferenciación poblacional derivada de los análisis moleculares aquí realizados (Ottewell, 2014). Asimismo, el análisis de estructura poblacional (obtenido en el programa STRUCTURE), reflejó como resultado un valor de K óptimo igual a 7 ($\Delta K=1.145556$), lo que indicaría que potencialmente las poblaciones de estas

cuatro islas estudiadas reflejan 7 distintos linajes pero, que a la vez mantienen un flujo genético entre sí, hecho que explicaría una baja diferenciación genética entre las poblaciones de cada isla (Rosenberg, 2004). Sin embargo, se debe considerar que el uso de solo 4 marcadores microsatélites puede influir en la determinación del número de linajes, ya que otras investigaciones sugieren que no se puede distinguir una estructura poblacional definida si se utilizan pocos primers de este tipo como se mencionó anteriormente (Le Roux, Wiczorek, & Meyer, 2008).

Los resultados obtenidos de las comparaciones moleculares, esta vez entre las poblaciones de *C. odorata* localizadas en las islas Galápagos y sus pares continentales (PCoA) (Anexo D), preliminarmente permiten evidenciar que existiría aparentemente una mayor afinidad genética de las poblaciones del archipiélago con las de la región Costa del Ecuador, por lo que en esta zona probablemente se encontraría su población de origen. Estudios observacionales previos que buscan analizar también este posible origen sin usar herramientas moleculares, mencionan que probablemente se llevaron semillas de *C. odorata* desde la región Costa hacia Galápagos (considerando que estas podrían adaptarse de mejor manera a las condiciones de las islas que son similares a las costas del Ecuador), con el objetivo de utilizar los individuos adultos como una barrera limitante entre el PNG y la zona agrícola de las islas San Cristóbal y Santa Cruz (Dominguez, 2016). Este estudio provee información que aparentemente confirma este hecho anecdótico.

5. CONCLUSIONES

Podría mencionarse preliminarmente que la diversidad genética de *C. odorata* en las islas Galápagos es relativamente baja de acuerdo con los resultados obtenidos de heterocigosidad esperada, como producto de un posible cuello de botella que generalmente ocurre cuando hay colonización de especies invasoras en islas.

Su introducción hacia Galápagos es probablemente el resultado de un solo evento de colonización (es decir se introdujo en una sola isla), desde donde posteriormente se llevaron nuevos individuos de este árbol invasor a otras islas, lo que explica por qué estas comparten una proporción significativa de alelos entre sí.

La comparación de las muestras analizadas en este estudio con las reportadas para el continente, permiten elucubrar preliminarmente que la posible población de origen de *C. odorata* en Galápagos estaría ubicada en la región Costa del Ecuador. Este hecho pudo haberse dado como resultado de aspectos históricos, debido a la posible introducción de semillas desde la Costa ecuatoriana hacia la región insular con fines de división territorial entre la zona agrícola y el área protegida del PNG.

Estos resultados proveen una línea base molecular para *C. odorata*, que a futuro en conjunto con los 5 primers no utilizados en este estudio (9 en total reportados por Hernández *et al.* 2008), proveerán una base de datos importantes para el manejo de esta planta considerada actualmente como una de las más invasoras en las islas Galápagos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Applied biosystems. (2014). *DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis*. Obtenido de Life technologies: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4474504.pdf>
- Arnaez, E., & Flores, E. (1988). Características de la madera de *Cedrela odorata* L (cedro amargo, Meliaceae) en Costa Rica". *Revista de Biología Tropical*.
- Asadobay, P. (2019). *Diversidad y Conectividad Genética del Cedro (Cedrela odorata, Meliaceae) en Ecuador continental*. Quito: Repositorio USFQ.
- Bais, H., & Vepachedu, R. (2003). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12958360>. *Science*.
- Carrión, T., Berjano, R., Guerrero, G., Figueroa, E., Tye, A., & Catillo, J. (2014). Fruit set and the diurnal pollinators of the invasive *Lantana camara* and the endemic *Lantana peduncularis* in the Galapagos Islands. *Weed Biology and Management*, 209-219.
- Charles Darwin Foundation. (2002). *A biodiversity vision for the Galápagos Island, The World Wildlife fund*.
- Dirección del Parque Nacional Galápagos. (2014). *Plan de Manejo de las Áreas Protegidas de Galápagos para el Buen Vivir*. Obtenido de http://www.galapagos.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2016/07/DPNG_Plan_de_Manejo_2014.pdf
- Dominguez, N. (2016). *Manejo de Cedrela odorata en Galápagos y su influencia en el ensamblaje de comunidades de plantas nativas y no nativas en los primeros estadios de sucesión*. Obtenido de Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12452/Tesis%20Isabel.Empastado.Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Farell, E., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates.

- Gardener, M., Atkinson, R., & Renteria, J. (2010). Eradications and People: Lessons from the Plant Eradication Program in Galapagos. *Restoration Ecology*.
- GenMarker. (2018). GeneMarker - Fragment Data Analysis Software. *Application/Script. Version 3.0.0*.
- Guézou, A., Trueman, M., Buddenhagen, C., Chamorro, S., Guerrero, A., Pozo, P., & Atkinson, R. (2010). An Extensive Alien Plant Inventory from the Inhabited Areas of Galapagos. *Plos One*.
- Hernández, D., Macedo, M., Nuñez, F., Sanchez, A., & Aguila, P. (2018). Morphological variation of *Cedrela odorata* (Meliaceae): contrast between natural and managed populations. *Acta Botánica Mexicana*.
- Hossein, M., Kordrostami, M., & Hassani, H. (2016). An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *Springer*.
- Hosseinzadeh, A., Mohammad, J., Zahra, A., Mohadjerani, M., & Tafrihi, M. (2016). Microsatellite (SSR) amplification by PCR usually led to polymorphic bands: Evidence which shows replication slippage occurs in extend or nascent DNA strands. *Molecular Biology Research Communications*.
- Kueffer, C., Daehler, C., Torres, C., Lavergne, C., Meyer, J., Rüdiger, O., & Silva, L. (2009). A global comparison of plant invasions on oceanic islands. *ELSEVIER*, 145-161.
- Le Roux, J., Wiczorek, A., & Meyer, J. (2008). *Genetic diversity and structure of the invasive tree Miconia calvescens in Pacific islands. Diversity and Distributions*. Obtenido de <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00504.x>
- Loeschcke, A., Volker, D., Tomiuk, J., & Jain, S. (2013). *Conservation Genetics*. Berlin: Library of Congress.

- Lucena, G., Sanchez, A., Barberan, C., Carrillo, J., Lopez, J., & Aguilar, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*.
- Mark, J., & Rivers, M. (2017). *Cedrela odorata*. Obtenido de The IUCN Red List of Threatened Species 2017: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32292A68080590.en>.
- Martinez, A., Rodero, A., & Vega, J. (2000). *Study using microsatellites of main varieties of iberian pig*. Córdoba: Zootec.
- Martinez, F., & Coquet, L. (2013). La introducción del contenido especies invasoras en el programa de la disciplina Botánica. *Redalyc*, 46.
- Mendez, J., Roman, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). *Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review*. Obtenido de Researchgate: https://www.researchgate.net/publication/239931374_Los_microsatelites_STR's_marcadores_moleculares_de_ADN_por_excelencia_para_programas_de_conservacion_Una_revision/link/00b49529def39deac2000000/download
- Moreira, P., & Oliveira, D. (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *GMR*.
- Ottewell, K. (2014). *Is there a consensus on what constitutes a high and low value of FST in population genetics?* Obtenido de ResearchGate: https://www.researchgate.net/post/Is_there_a_consensus_on_what_constitutes_a_high_and_low_value_of_FST_in_population_genetics

- Ottewell, K., Bickerton, D., Byrne, M., & Lowe, A. (2015). Bridging the gap: a genetic assessment framework for population-level threatened plant conservation prioritization and decision-making. *Biodiversity Research*.
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. (1999). BOTTLENECK: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. *The Journal of Heredity*.
- Ramirez, A., Hartley, R., Ortiz, M., Ulloa, O., & Nuñez, I. (2015). Genetic diversity analysis in the reproductive nuclei of heavy breeds of the National Equine Promotion Plan by using microsatellite loci. *Austral Journal of Veterinary Science*.
- Renteria, J., & Buddenhagen, C. (2006). Invasive plants in the scalesia pedunculata forest at Los Gemelos, Santa Cruz, Galápagos. *Research Articles*, 31-35.
- Rivas, G., & Rivas, M. (2018). Allelopathic Impacts of the Invasive Tree *Cedrela odorata* L. (Meliaceae, Sapindales = Magnoliidae) in the Galapagos Flora. *Springer International Publishing*.
- Rivas, G., Benitez, F., Rueda, D., Sevilla, C., & Mena, C. (2018). A methodology for mapping native and invasive vegetation coverage in archipelagos: An example from the Galápagos Islands. *Progress in Physical Geography*.
- Robledo, J., & Gonzales, S. (2009). Marcadores moleculares y ecología del movimiento. *Ecosistemas*, 44-51.
- Rosenberg, N. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 137-138.
- RStudio. (2020). The R Project for Statistical Computing.
- Saghai-Marooif, M., Soliman, K., Jorgensen, R., & Allard, R. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and

- population dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8014-8018.
- Soldati, C., Inza, V., Fornes, L., & Zelener, N. (2014). Cross transferability of SSR markers to endangered *Cedrela* species that grow in Argentinean subtropical forests, as a valuable tool for population genetic studies. *ELSEVIER*, 8-16.
- Stuessy, T., Takayama, K., Lopez, P., & Crawford, D. (2014). Interpretation of patterns of genetic variation in endemic plant species of oceanic islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Tautz, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 6463-6471.
- Thermo Scientific. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer*. Obtenido de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/NanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf>
- Trueman, M., Standish, R., & Hobbs, R. (2014). Identifying management options for modified vegetation: Application of the novel ecosystems framework to a case study in the Galapagos Islands. *ELSEVIER*, 1-13.
- Urquia, D. (2019). *Psidium guajava* in the Galapagos Islands: Population genetics and history of an invasive species. *PLOS ONE*.
- Zhang, Z., & Hou, X. (2004). Strategies for development of SSR molecular markers. *Europe PMC*.

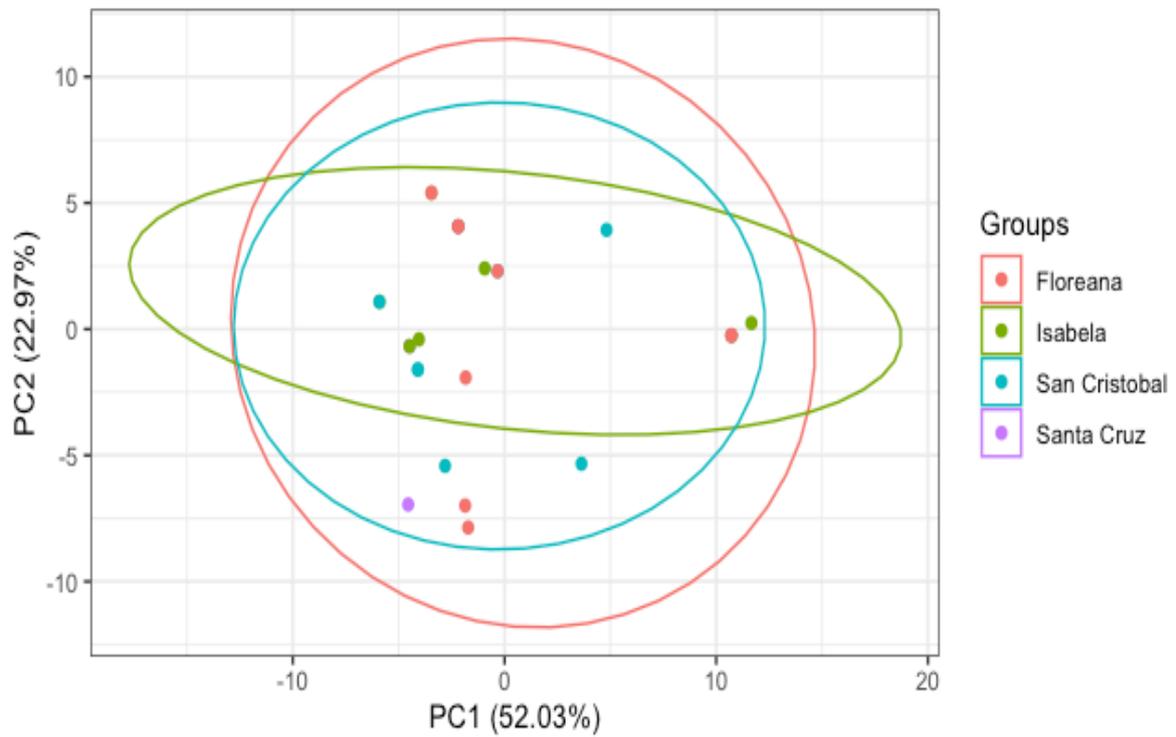
7. ANEXOS

Anexo A. Mapa georreferenciado de individuos de *C. odorata* en las 4 islas donde se encuentra presente



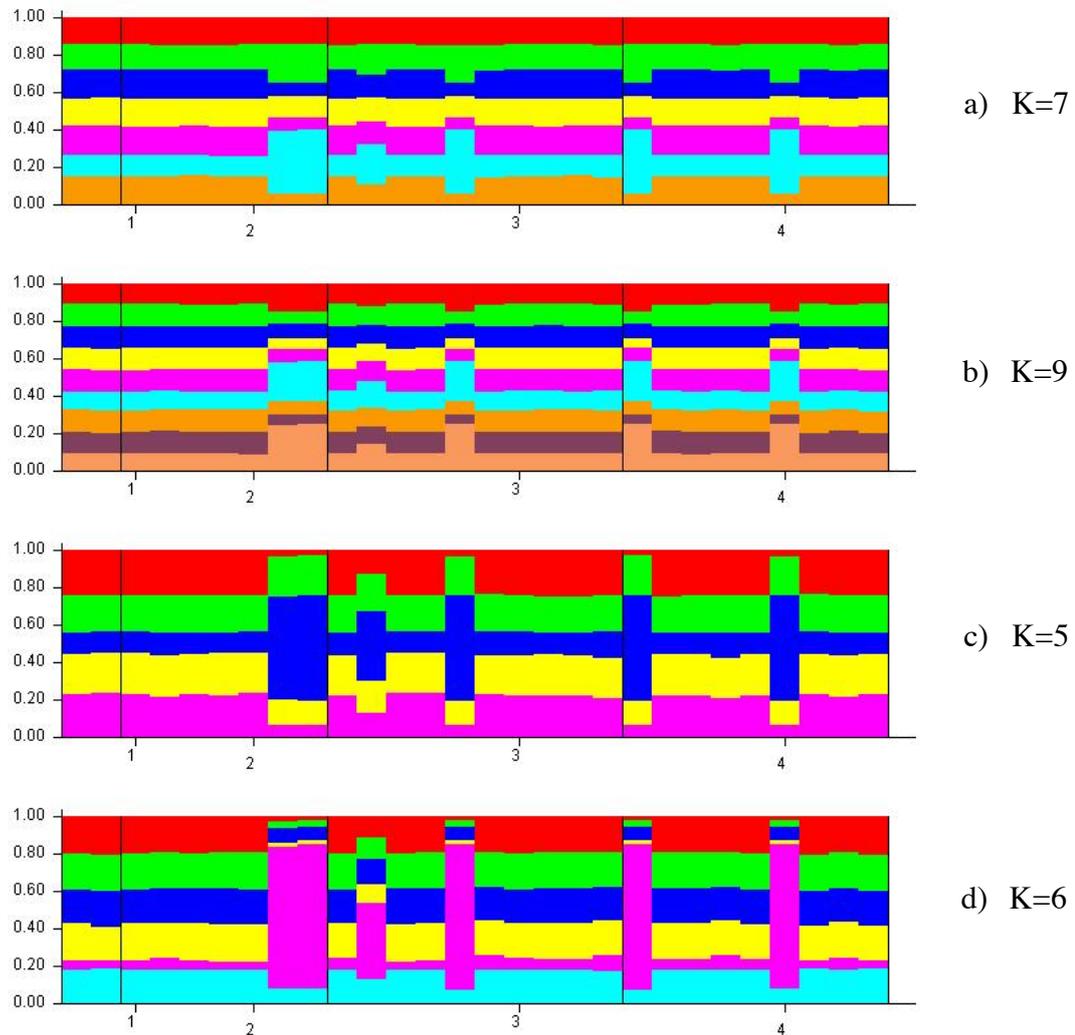
Nota. Cada punto marcado con color azul representa la localización (obtenidas con GPS) de individuos de *C. odorata* colectados para este estudio. Este diseño en la colección buscó recolectar muestras considerando rangos altitudinales y de expansión de *C. odorata* en las islas Galápagos.

Anexo B. Análisis de coordenadas principales (PCoA) obtenido de muestras de *C. odorata* colectadas en Galápagos



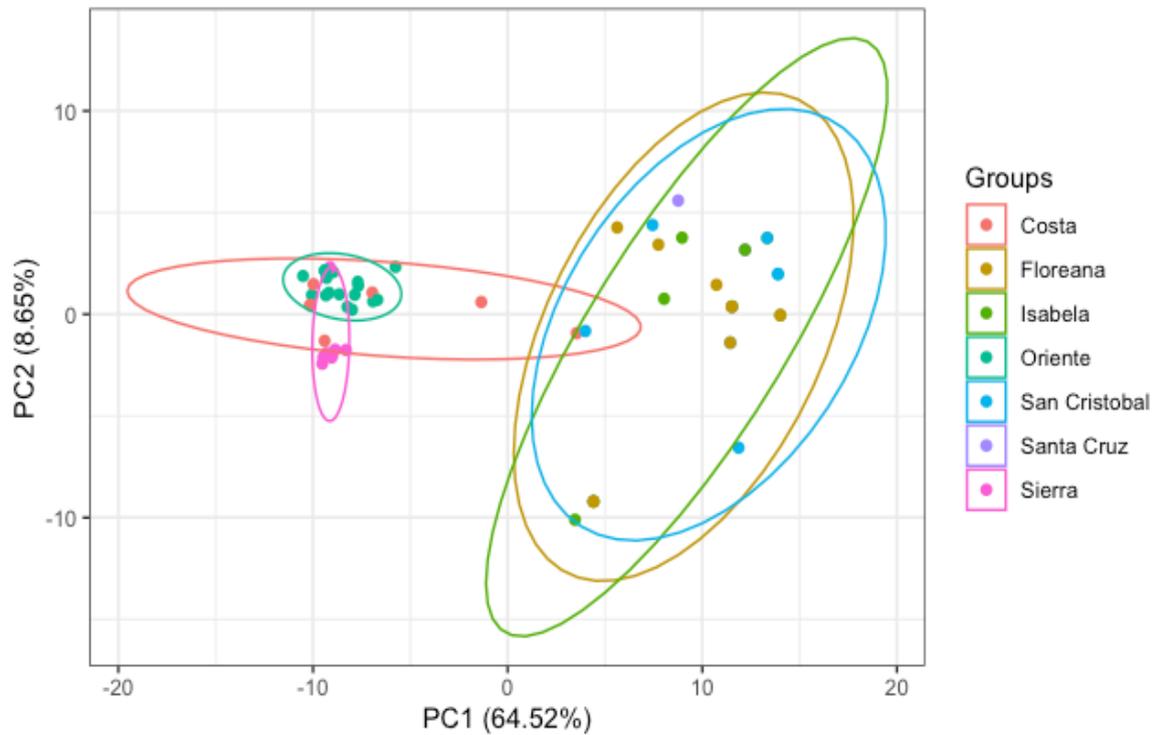
Nota. Los puntos de colores presentados corresponden a 28 individuos de *C. odorata* analizados mediante el uso de 4 marcadores microsatélites. Las elipses (con un intervalo de confianza del 95%) y el color, representan a cada clúster analizado.

Anexo C. Valores óptimos de K obtenidos en el programa STRUCTURE con datos de 28 individuos de las 4 islas analizadas



Nota. El valor óptimo de K representa la estructura poblacional de los individuos estudiados. Donde los valores de Delta K más altos indican que existe una mejor explicación de datos genotípicos obtenidos mediante inferencia bayesiana. (Pritchard, Wen, & Falush, 2010). Para este análisis, los valores de Delta K fueron: K=7 ($\Delta K=1.145556$), K=9 ($\Delta K=0.741227$), K=5 ($\Delta K=0.713511$), y K=6 ($\Delta K=0.591250$). El número 1 en el eje x corresponde a Floreana, el 2 a Isabela, 3 San Cristóbal y 4 Santa Cruz.

Anexo D. Análisis de coordenadas principales (PCoA) que compara la distancia genética entre muestras de las islas Galápagos con muestras del Ecuador continental



Nota. Análisis de coordenadas principales (PCoA) correspondiente a 61 individuos de *C. odorata* de 4 islas de Galápagos (28 individuos) y 3 regiones del Ecuador (33 individuos), obtenido a partir de el uso de 4 marcadores microsatélites (utilizando el paquete estadístico adegenet en el software RStudio). Las elipses (con un intervalo de confianza del 95%) y el color, representan a cada clúster analizado.