

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Diversidad y Conectividad Genética del Cedro (*Cedrela odorata*,  
Meliaceae) en Ecuador continental**

**Pacarina Elizabeth Asadobay Vintimilla**

**Biología**

Trabajo de integración curricular presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Licenciada en Biología, concentración en Biología Molecular

Quito, 23 de diciembre de 2019

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y  
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

**Diversidad y conectividad genética del cedro (*Cedrela odorata*, Meliaceae)  
en Ecuador continental**

**Pacarina Elizabeth Asadobay Vintimilla**

**Calificación:**

**Nombre del profesor, Título académico**

**Gonzalo Rivas-Torres, Ph.D.**

**Firma del profesor:**

\_\_\_\_\_

Quito, 23 de diciembre de 2019

### **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.

Firma del estudiante:

---

Nombres y apellidos:

Pacarina Elizabeth Asadobay Vintimilla

Código:

00117124

Cédula de identidad:

0650064579

Lugar y fecha:

Quito, 23 de diciembre de 2019

## Agradecimientos

Agradezco a toda mi familia y amigos por apoyarme constantemente, mostrarme todo su cariño y no dejar que me rinda ante las adversidades. Principalmente a mis padres, hermano y mi tío Ángel por creer en mí desde el principio de la carrera.

A mis profesores, en especial a Gonzalo Rivas-Torres, quien me dio la oportunidad de desarrollar este proyecto. Igualmente a María de Lourdes Torres por permitirme trabajar en su laboratorio y guiarme en diferentes situaciones. A Estefanía Rojas, Paula Erazo, Pamela Borja y Andrea Argudo por su colaboración en diferentes etapas del proyecto. De manera general a todos quienes conforman el Laboratorio de Biotecnología Vegetal.

Al Programa de Diversidad Étnica, en especial a David Romo, por brindarme el apoyo emocional y financiero necesario en diferentes ámbitos de mi vida estudiantil.

A Diego Urquía, quien ha sido mi compañero incondicional, mi animador personal y alguien muy importante en mi vida personal y estudiantil. A los amigos que hice durante estos años universitarios, Salomé, Carla y Génesis, por su confianza y amistad.

Finalmente, agradezco la colaboración del Ministerio del Ambiente por otorgarnos los permisos para la investigación. A Janeth Santiana, Walter Palacios y Juan Iglesias por su aporte en la taxonomía de la especie y apoyo personal. A la ex directora Nacional Forestal, Jessica Coronel.

## Resumen

*Cedrela odorata* L. (Meliaceae), es un árbol caducifolio nativo de América tropical, presente en pastizales y bosques, y con un rango altitudinal de 0 a 1200 m.s.n.m. En Ecuador es conocido por ser un árbol maderable y de gran importancia económica. Por ello, la tala indiscriminada para obtener su madera representa la principal amenaza para la conservación de la especie, catalogada como vulnerable y CITES. El objetivo del presente estudio fue determinar la diversidad genética y conectividad poblacional de *C. odorata* en el Ecuador continental –donde no existe esta información– además de proveer datos para tomar medidas de manejo enfocadas a la conservación de la especie. Para cumplir este objetivo, se colectaron hojas de 33 individuos de 7 provincias de las 3 regiones del Ecuador continental para, posteriormente, extraer su ADN usando un protocolo para muestras recalcitrantes con el fin de amplificar 9 regiones microsatélites. Se identificaron un total de 105 alelos con un promedio de 11.7 alelos por locus. La heterocigosidad global esperada alcanzó un valor de 0.814, lo que se considera una diversidad genética alta. La heterocigosidad esperada para la región Costa fue de 0.604, para la Sierra de 0.348 y para la Amazonía de 0.741. El índice  $F_{st}$  tuvo valores de 0.114 entre Costa y Amazonía, 0.212 entre Sierra y Amazonía y 0.337 entre Costa y Sierra, indicando que la Costa y la Amazonía son las regiones que potencialmente mantienen más flujo génico, mientras que la Sierra se presenta como un grupo más separado de los anteriores. Asimismo, (según un análisis STRUCTURE) se encontró una estructura poblacional definida para las 3 regiones en estudio ( $K=2$ ): dos linajes se desprenden de esta estructura poblacional, uno que agrupa la Costa y la Amazonía y otro para la Sierra. En conclusión, *C. odorata* posee una alta diversidad genética global; los grupos de la Costa y Amazonía están más relacionadas genéticamente entre sí, mientras que la Sierra se muestra como un grupo separado. Debido a la distinta diversidad y conectividad genética encontrada en cada región analizada, se recomienda llevar a cabo medidas de manejo diferenciadas para cada una de ellas.

**Palabras clave:** *Cedrela odorata*, cedro, Ecuador, microsatélites, diversidad genética, estructura genética

## Abstract

*Cedrela odorata* L. (Meliaceae), is a deciduous tree native to tropical America. It is distributed in grasslands and forests, at an altitudinal range of 0 to 1200 m.a.s.l. In Ecuador it is a timber tree of great economic importance. Therefore, indiscriminate logging to obtain its timber represents the main threat to the conservation of the species, classified as vulnerable and as CITES. Thus, the goal of this study was to determine the genetic diversity and population connectivity of *C. odorata* in continental Ecuador -where this information does not exist- in addition to providing data to take management decisions focused on the conservation of the species. To reach these objectives, leaves were collected from 33 individuals from 7 provinces of the 3 natural regions of mainland Ecuador, then DNA was extracted using a protocol for recalcitrant samples to finally amplify 9 microsatellite regions through PCR. A total of 105 alleles were identified with an average of 11.7 alleles per locus. The global expected heterozygosity had a value of 0.814, which is considered as high genetic diversity. The expected heterozygosity for the Coastal region was 0.604, for the Highlands 0.348 and for Amazon region 0.741. The pairwise  $F_{st}$  had values of 0.114 between Coast and Amazon, 0.212 between Highlands and Amazon and 0.337 between Coast and Highlands. This suggests that the Coastal and the Amazon cedar populations would have some gene flow among them, while the Highlands population would be isolated from the previous ones. Likewise, (according to a STRUCTURE analysis) a defined population structure was found for the 3 regions under study ( $K = 2$ ); two lineages define this population structure, one grouping the Coast and the Amazon populations, and another one for the Highlands population. In conclusion, *C. odorata* had a high global genetic diversity; Coast and Amazon populations are more genetically related to each other, while the Highlands population was shown as a separate group. Due to the genetic diversity and connectivity found in each region analyzed, it is recommended to carry out differentiated management measures for each of them.

**Key words:** *Cedrela odorata*, Spanish red cedar, Ecuador, microsatellite, genetic diversity, genetic structure.

## Tabla de Contenido

1. Introducción.....	12
1.1. Especies maderables importantes en bosques tropicales.....	12
1.2. El Género <i>Cedrela</i> y <i>Cedrela odorata</i> .....	12
1.3. Importancia de la diversidad genética y los marcadores moleculares .....	14
2. Objetivos.....	17
2.1. Objetivo general .....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. Justificación .....	18
4. Área de estudio .....	19
5. Materiales .....	20
5.1. Recolección de material vegetal.....	20
5.2. Extracción de ADN genómico .....	20
5.3. Cuantificación y dilución del ADN genómico extraído.....	20
5.4. Amplificación de regiones microsatélites .....	21
5.5. Electroforesis en gel de agarosa .....	21
5.6. Genotipado .....	22
5.7. Análisis estadístico.....	22
6. Métodos .....	23
6.1. Recolección de muestras de <i>Cedrela odorata</i> en el Ecuador continental .....	23
6.2. Extracción y cuantificación de ADN .....	24
6.3. Amplificación del ADN empleando marcadores microsatélites .....	25
6.4. Determinación del genotipo de los individuos.....	26
6.5. Análisis de diversidad genética .....	27
6.6. Análisis de conectividad genética poblacional.....	27
7. Resultados.....	29
7.1. Extracción y cuantificación de ADN .....	29
7.2. Amplificación y genotipado de loci microsatélites .....	29
7.3. Análisis de datos.....	29
7.3.1. Diversidad genética de <i>C. odorata</i> en Ecuador continental .....	29
7.3.2. Distribución de la diversidad, estructura y conectividad genética de <i>C. odorata</i> .....	31
8. Discusión .....	33
8.1. Colección de muestras de <i>C. odorata</i> y extracción de ADN .....	33

8.2.	Amplificación y genotipado de loci microsatélites .....	34
8.3.	Diversidad genética de <i>C. odorata</i> en Ecuador continental .....	35
8.4.	Distribución de la diversidad genética y estructura poblacional .....	36
8.4.1.	Aislamiento genético de la Sierra .....	36
8.4.2.	Conectividad genética entre Costa y Amazonía .....	39
8.5.	Medidas de manejo de <i>C. odorata</i> .....	39
9.	Conclusiones .....	41
10.	Recomendaciones .....	42
11.	Referencias Bibliográficas .....	43
12.	Tablas .....	50
13.	Figuras .....	53
14.	Anexos .....	58



## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Loci microsatélites empleados como marcadores moleculares en este estudio, los fluoróforos asignados, la temperatura de annealing, el número de ciclos del termociclado y el rango de tamaño de los alelos encontrados en pares de bases de cada locus.....	50
<b>Tabla 2.</b> Resumen de la información proporcionada por 9 marcadores SSR para la caracterización genética de <i>C. odorata</i> en el Ecuador continental. ....	50
<b>Tabla 3.</b> Resumen de los parámetros de diversidad genética para cada región en donde se recolectaron individuos de <i>C. odorata</i> .....	51
<b>Tabla 4.</b> Pairwise de alelos compartidos en las tres regiones de <i>C. odorata</i> estudiadas.....	51
<b>Tabla 5.</b> Comparación de los valores pairwise Fst entre las tres regiones analizadas. ....	51
<b>Tabla 6.</b> Resultados del AMOVA realizado para las muestras de <i>C. odorata</i> de las tres regiones en estudio. ....	52
<b>Tabla 7.</b> Valores para estimación del K óptimo a partir del análisis en STRUCTURE con información previa de las regiones de origen de las muestras de <i>C. odorata</i> .....	52

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Individuos de <i>C. odorata</i> colectados para el estudio.....	53
<b>Figura 2.</b> Mapa georreferenciado de las 33 muestras colectadas en las 3 regiones de Ecuador continental analizadas en este estudio.....	54
<b>Figura 3.</b> Electroforesis en gel agarosa al 1% del ADN extraído a partir de hojas de <i>C. odorata</i> .....	55
<b>Figura 4.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de 9 muestras con el primer Ced54.....	55
<b>Figura 5.</b> Análisis de coordenadas principales (PCoA) bidimensional, de 33 individuos de <i>C. odorata</i> utilizando datos de diversidad genética de 9 marcadores SSR. ....	56
<b>Figura 6.</b> Resultados de STRUCTURE considerando los 33 individuos muestreados en Ecuador continental agrupados en 3 regiones.....	57

## Índice de Anexos

<b>Anexo A.</b> Provincias donde se colectaron los 33 individuos colectados de <i>C. odorata</i> para este estudio.....	58
<b>Anexo B.</b> Secuencias de los 9 pares de primers (forward y reverse) con los que se amplificaron los loci microsatélites analizados en este trabajo y los tamaños esperados en pares de bases.	60
<b>Anexo C.</b> Protocolo de extracción de ADN sin modificaciones para muestras recalcitrantes.....	61
<b>Anexo D.</b> Cuantificación en el NanoDrop 2000 de las 33 muestras de <i>C.odorata</i> empleadas en este estudio.....	62
<b>Anexo E.</b> Matriz de alelos de las 33 muestras con los 9 primers empleados en este estudio.	63

## 1. Introducción

### 1.1. Especies maderables importantes en bosques tropicales

Los bosques tropicales son zonas con alta concentración de la biodiversidad pero con permanentes amenazas (Pennington et al., 2010). Los trópicos albergan varios tipos de bosques que junto con las distintas condiciones ambientales brindan hábitats únicos para la diversificación de especies (Pennington et al., 2010). Por ejemplo, en Ecuador se ha reportado alrededor de 5000 especies de árboles (Palacios & Jaramillo, 2016). De ellas, las denominadas especies forestales son especialmente susceptibles a distintas presiones, siendo la tala selectiva para el uso comercial de su madera, una de las mayores amenazas para su supervivencia (Palacios & Jaramillo, 2016).

La madera ha sido un recurso ampliamente utilizado desde hace varios siglos pues con ella se elaboraban muebles, barcos, casas, etc. (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Las especies maderables de interés (entre las cuales se pueden enlistar a *Swietenia macrophylla* o caoba –Meliaceae-, *Carapa amorphocarpa* o tangare –Meliaceae-, *Caryodapnopsis theobromifolia* –Lauraceae-, *Magnolia dixonii* o cucharillo –Magnoliaceae-, *Humiriastrum procerum* o chanul –Humiriaceae-) se encuentran distribuidas en varias zonas de Ecuador (Palacios & Jaramillo, 2016). Entre estas especies útiles, *Cedrela odorata* (Meliaceae) es una de las especies más cotizadas, así como varias otras potenciales especies dentro de este Género (Pennington & Muellner, 2010).

### 1.2. El Género *Cedrela* y *Cedrela odorata*

El género *Cedrela* es monofilético y contiene 17 especies reconocidas (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Probablemente su diversificación se dio en el Mioceno tardío y Pleistoceno temprano (Pennington et al., 2010). La mayoría de especies han registrado rangos de distribución estrictos, distribuyéndose únicamente en ambientes tropicales y subtropicales

de América, desde México hasta el norte de Argentina (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Una característica importante de los árboles de *Cedrela* es su altura pues crecen hasta los 40 metros y alcanzan 1.2 metros de diámetro, lo que entre otras cosas las hace tan apetecidas para el uso comercial de su madera (Pennington, Muellner, & Wise, 2010).

*C. odorata* es la especie de mayor distribución y uso comercial dentro de este Género, características que han llevado a su sobreexplotación desde hace 250 años aproximadamente (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Se distribuye desde el norte de México, pasando por América central y el Caribe, hasta Brasil (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Se encuentra en bosques tropicales, subtropicales y climas semihúmedos, desde el nivel del mar hasta los 1200 m.s.n.m. (Mark, & Rivers, 2017). Su presencia es común en suelos bien drenados, suelos volcánicos y tolerando largas temporadas de sequía (Pennington, Muellner, & Wise, 2010). Asimismo, es una especie pionera, de rápido crecimiento en bosques secundarios, polinizada por insectos y dispersada por el viento (Pennington et al., 1981; Cavers et al., 2004).

Los árboles de *C. odorata* son monoicos o dioicos caducifolios con fuste recto, corteza fuertemente fisurada y de color rojizo (Palacios, 2016). Las ramas presentan lenticelas pardas o marrones y albergan hojas imparipinnadas (rara vez pinnadas) (Palacios, 2016). Igualmente, sus folíolos son falcados-oblongos, de 5-18 pares, glabros o pubescentes, verdes claros y asimétricos en la base (Palacios, 2016). Presentan una inflorescencia en panícula terminal conformada por flores unisexuales, cáliz cupuliformes o con 5 sépalos libres y 5 pétalos, de color crema (Palacios, 2016). Los frutos son cápsulas semileñosas, oblongas, lenticeladas-color café claro, con 5 valvas que se abren cuando maduran para liberar varias semillas aladas (Cárdenas et al. 2015; Palacios, 2016). El follaje y la madera presenta olor a ajo, cualidad atractiva para la fabricación de cajas de habanos (Pennington, Muellner, & Wise, 2010).

La sobreexplotación de la madera de *C. odorata* ha derivado en diversas acciones para su protección y conservación. Actualmente se la cataloga como especie “vulnerable” de

acuerdo a la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) (Mark, & Rivers, 2017). Asimismo, desde el 2002 *C. odorata* se encuentra en el apéndice III de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), es decir, se requiere un permiso explícito por parte de la autoridad competente para la extracción de la madera (Mark, & Rivers, 2017). En Ecuador *C. odorata* fue incluida en el CITES en agosto de 2019 (Vergara, 2019). Dichas medidas han tenido importantes implicaciones para el comercio de la madera y la conservación de esta especie que se cosecha en gran medida, en toda su área de distribución en los trópicos americanos (Muellner, Pennington, & Chase, 2009).

En Ecuador, así como en otros sitios, la madera de *C. odorata* es reconocida por su belleza, durabilidad y resistencia al ataque de plagas (Palacios & Jaramillo, 2016). Muchos acabados de las construcciones coloniales se han realizado con madera de *Cedrela* (Pennington & Muellner, 2010; Palacios, 2016). Es por ello que la deforestación de la especie en Ecuador ha ocasionado la aplicación de vedas para evitar su extinción (Muñoz, 2015). Debido a la gran demanda de su madera y la aparente disminución de sus poblaciones, el Ministerio del Ambiente necesita de herramientas que ayuden en el manejo adecuado de este recurso forestal, mismas que deben incluir estudios genéticos para responder preguntas básicas sobre su conectividad y estructura poblacional.

### **1.3. Importancia de la diversidad genética y los marcadores moleculares**

La diversidad genética se define como la cuantificación de la variabilidad genética dentro de una población, misma que se puede medir a través de la heterocigosidad calculada para los individuos en análisis (Hughes, Inouye, Johnson, Underwood, & Vellend, 2008). De igual forma, la diversidad genética permite entender los procesos evolutivos dentro de una especie y diferentes estudios han demostrado que esta también puede explicar y afecta a procesos ecológicos significativos; por ejemplo, la productividad primaria, recuperación de la

población ante disturbios, competencia interespecífica, estructura de la comunidad y flujo de energía y nutrientes (Lodish, 2006; Hughes, Inouye, Johnson, Underwood, & Vellend, 2008). Para comprender estas diferencias genéticas entre los individuos se emplean los marcadores moleculares (Griffiths et al., 2000). Un marcador molecular es un sitio de heterocigosidad para una variación del ADN que no esté asociada con ninguna variación fenotípica medible (Griffiths et al., 2000; Lodish, 2006).

Entre los marcadores moleculares más usados para el estudio de conectividad y diversidad genética entre y dentro de las poblaciones se encuentran los microsatélites (simple sequence repeat o SSR) (Hughes, Inouye, Johnson, Underwood, & Vellend, 2008). Los microsatélites son secuencias repetitivas de ADN de entre 2 y 5 pares de bases, repartidos uniformemente en el genoma de las especies eucariotas (Lodish, 2006). Se los califica como marcadores neutros, es decir, el flujo de genes y la deriva genética, en lugar de la selección, deberían afectar su estructura genética (Luebert & Weigend, 2008). Además, otras características los hacen ideales para su uso en estudios genéticos: están presentes en grandes cantidades, a menudo ubicados físicamente cerca o dentro de los genes, muestran una tasa de mutación variable pero relativamente alta en relación con los loci no microsatélites y son marcadores codominantes (logrando la distinción entre individuos homocigotos y heterocigotos) (Lodish, 2006; Applied Biosystems, 2014).

Para *C. odorata* hasta el momento existe muy poca información a nivel genético y de marcadores moleculares como los antes mencionados (Hernández et al., 2008). Los estudios relevantes en estas áreas se han realizado (en su mayoría) a nivel regional y esto ha permitido que indirectamente se conozcan un número determinado de marcadores microsatélites que pueden servir para análisis de tipo poblacional (Hernández et al., 2008). A pesar que regionalmente exista algo de información sobre esta especie de importancia, en Ecuador se desconoce la diversidad y conectividad genética de las poblaciones de *C. odorata*, información

que como ya se ha expuesto anteriormente, ayudaría a comprender los procesos ecológicos que regulan las poblaciones de diferentes regiones en el país y a aplicar medidas de conservación para este árbol maderable.

Por ello, el presente estudio busca de manera general proveer información genética relevante y actualizada de la especie maderable y en peligro *Cedrela odorata* en el Ecuador continental. Específicamente, esta investigación buscó: primero, optimizar un protocolo de extracción de ADN a partir de hojas para muestras de Ecuador; segundo, probar si el uso de 9 marcadores microsatélites específicos para *C. odorata* marcados con fluoróforos publicados en otros estudios son funcionales para el posterior análisis del genotipado de esta especie; tercero, determinar la diversidad genética y compararla entre diferentes poblaciones de *C. odorata* en Ecuador; y cuarto, establecer la conectividad genética en diferentes poblaciones de *C. odorata* de Ecuador continental mediante el uso de marcadores moleculares. Finalmente, los resultados de estos objetivos buscan proveer información general para la correcta toma de medidas de manejo de esta especie de importancia para el país y la región.



## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo general

Proveer información genética relevante y actualizada de la especie maderable y en peligro *Cedrela odorata* en el Ecuador continental.

### 2.1. Objetivos específicos

- Optimizar un protocolo de extracción de ADN a partir de hojas para muestras de Ecuador.
- Amplificar 9 marcadores microsatélites específicos para *Cedrela odorata* marcados con fluoróforos para posterior análisis del genotipado de esta especie.
- Determinar la diversidad poblacional y compararla entre diferentes regiones donde se registra *Cedrela odorata* en Ecuador.
- Establecer la conectividad genética dentro y entre diferentes poblaciones de *Cedrela odorata* de Ecuador continental mediante el uso de marcadores moleculares.
- Proveer información general para la correcta toma de medidas de manejo de esta especie en Ecuador.

### 3. Justificación

La explotación de especies maderables en Ecuador ha sido una actividad desarrollada con escasos controles y que afecta la supervivencia de las poblaciones, volviéndose una práctica insostenible. Una de las especies más amenazadas como consecuencia de la tala desmedida es el cedro (*Cedrela odorata*). El aprovechamiento forestal de esta especie, cuya madera es muy buscada en diferentes mercados, ha sido tema de debate entre diferentes actores como el Ministerio del Ambiente y los madereros.

El conocimiento de la diversidad y conectividad genética de distintas poblaciones de una especie puede ser una fuente de información valiosa. En el caso de *C. odorata*, este tipo de información genética entre otras cosas, permite evaluar la probabilidad de éxito de estrategias de reforestación y manejo en diferentes regiones del Ecuador.

#### 4. Área de estudio

La presente investigación se realizó en base al muestreo realizado en las 3 regiones naturales del Ecuador continental (Costa, Sierra y Amazonía). La Costa es una región caracterizada por la presencia de bosques húmedos en el norte, como en las provincias de Manabí y Esmeraldas. A lo largo del tiempo, la Costa ha sido una región con una importante extracción de recursos madereros y que presenta varios tipos de monocultivos que han contribuido a disminuir significativamente la extensión de bosques naturales. Por su parte, la Sierra y la presencia de la Cordillera de los Andes que la define geográficamente, permite la existencia de diferentes condiciones ambientales, tanto en la Cordillera oriental como occidental. Por ello ciertas zonas de la Sierra, por ejemplo el noroccidente de la provincia de Pichincha cuenta con bosques montanos –mismos que son muy húmedos- pero presentan una temperatura promedio anual menor que sus pares de la Costa. Al igual que esta última región, varias zonas de la Sierra han sufrido una elevada tasa de deforestación en las últimas décadas del siglo pasado. En cambio la Amazonía, es una región con bosques húmedos, temperatura promedio alta y lluvia abundante durante todo el año. Si bien ha sufrido gran la explotación maderera, también contiene zonas muy conservadas pues son áreas de difícil acceso. La especie maderable *C. odorata*, se registra en estas tres áreas en el Ecuador continental (Pinto, Pérez, Ulloa & Cuesta, 2018).

## 5. Materiales

### 5.1. Recolección de material vegetal

- Hojas jóvenes de árboles adultos de *C. odorata* recolectadas en Ecuador continental (Figura 1)
- GPS
- Cuaderno de campo
- Fundas con sellado para preservar material genético
- Sílica gel

### 5.2. Extracción de ADN genómico

- Hojas de *C. odorata* de los individuos colectados
- Mortero y pistilo
- Nitrógeno líquido
- Buffers 1 y 2 (Anexo C)
- $\beta$ -mercaptoetanol
- Etanol 70%
- Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1
- Cama de arena
- CTAB
- PVP 5000
- Ultra Pure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)
- Microcentrífuga 5415D (Eppendorf)

### 5.3. Cuantificación y dilución del ADN genómico extraído

- ADN de los individuos colectados de *C. odorata*

- Ultra Pure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)
- NanoDrop 2000 Thermo Scientific

#### **5.4. Amplificación de regiones microsatélites**

- Tubos Eppendorf de 0.6 ml
- Tubos Eppendorf de 0.2 ml
- Taq platinum ADN polimerasa 5U/ $\mu$ l de Invitrogen
- Buffer de PCR 10X de Invitrogen
- MgCl<sub>2</sub> 50mM
- dNTPs 10mM
- Ultra Pure Distilled Water de Gibco (Agua de PCR)
- 9 pares de primers SSRs (Anexo A)
- BSA 10mg/ml

#### **5.5. Electroforesis en gel de agarosa**

- SeaKem ® LE Agarose
- SYBR ® Safe DNA gel stain de Invitrogen
- Fuente de poder EPS-300 II (C.B.S. Scientific)
- EC360M Electrophoretic Gel System (Maxicell®)
- MGU-502T Horizontal Midi-Gel Kit de C.B.S Scientific
- Tris-Ácido bórico-EDTA (TBE) 1X
- Blue Juice 10X Loading Buffer de Invitrogen
- Ladder 100 pb de Invitrogen
- Fotodocumentador Biorad Gel Doc XR

## 5.6. Genotipado

- Placas MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate de Applied Biosystems®
- 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems ®
- Software GeneMarker ® de SoftGenetics

## 5.7. Análisis estadístico

- Programa RStudio (RStudio Team, 2019)
  - Paquete adegenet (Jombart, et al., 2018)
  - Paquete ape (Paradis, et al., 2017a)
  - Paquete pegas (Paradis, et al., 2017b)
  - Paquete ade4 (Dray, et al., 2018)
  - Paquete diversity (Keenan, 2017)
  - Paquete hierfstat (Goudet & Jombart, 2015)
  - Paquete ggplot2 (Whickham & Chang, 2016)
  - Paquete ggtree (Yu, et al., 2017)
- Programa HP Rare (Kalinowski, 2009)
- Programa STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al, 2000)
  - Structure Harvester (Earl y von Holdt, 2014)
  - CLUMPP 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg, 2007)
  - Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004)
  - Adobe Illustrator

## 6. Métodos

### 6.1. Recolección de muestras de *Cedrela odorata* en el Ecuador continental

Durante los meses de mayo y junio de 2018 se realizaron salidas de campo para la recolección de muestras de *C. odorata* (Meliaceae-Angiospermas, Dicotiledóneas) en 7 provincias de Ecuador continental (Anexo A). Se recolectaron un total de 33 individuos de *C. odorata* (Figura 2). El recorrido en cada provincia se estableció a partir de colecciones del Herbario Nacional del Ecuador (QCNE) y del conocimiento del experto, Ingeniero Walter Palacios, especialista en la distribución y taxonomía de la Familia Meliaceae –incluido el Género *Cedrela* para el país-. El muestreo también fue acompañado por botánicos del Ministerio del Ambiente, Juan Iglesias y Janeth Santiana, quienes tienen amplio conocimiento en colecciones vegetales. Cada individuo colectado contó con su correspondiente voucher, es decir, una colección de Herbario que permite analizar su taxonomía. Estos vouchers reposan en la colección del QUSF del investigador Gonzalo Rivas-Torres. Igualmente los individuos determinados como *Cedrela odorata* y por ende colectados en este estudio, fueron verificados por el especialista Ing. Palacios. No se colectaron más individuos debido a la dificultad y lejanía para colectarlos en sus poblaciones naturales.

De los individuos determinados como *Cedrela odorata*, se recolectaron 2 o 3 hojas jóvenes por árbol. Las hojas se colocaron en una funda ziploc de sellado especial con sílica gel y su número de identificación correspondiente a la muestra y su ubicación geográfica. A continuación las hojas totalmente secas de cada individuo se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad San Francisco de Quito donde se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento. Todas las colecciones de vouchers botánicos y muestras de hojas para análisis genéticos se realizaron en base a lo determinado en los permisos 025-2018-IC-FLO, y MAE-DNB-2018-0106 correspondientes y expedidos por el Ministerio del Ambiente como autoridad competente.

## 6.2. Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción del ADN de las muestras se siguió el protocolo de Rezadoost *et al.* (2016) con algunas modificaciones para incrementar la concentración del ADN genómico. El protocolo original se muestra en el Anexo C. Primero, se obtuvo una submuestra del material seco de cada individuo correspondiente a 20 mg de material vegetal, mismo que inmediatamente se colocó en un mortero previamente desinfectado con etanol al 70%. A esta submuestra se añadió nitrógeno líquido hasta cubrir el material vegetal y se maceró con un pistilo (punto 1 modificado, Anexo C). Segundo, se añadieron los 20 mg del material vegetal y 400 µl de Buffer 1 y 0.1% (w/v) PVP en un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, este material fue agitado en un vórtex por 20 segundos (s) y se transfirió este tubo a una cama de arena a 60°C donde se mantuvieron por 30 minutos (min). Tercero, en este tubo con la muestra correspondiente, se añadieron 400 µl de cloroformo–alcohol isoamílico (24:1, v/v) y se agitó fuertemente por 2 min. A continuación se centrifugó el tubo por 15 min a 10000 rpm. Cuarto, se transfirieron 300 µl de sobrenadante a un tubo nuevo de 1.5 ml, se agregó 1/2 volumen de Buffer 2 y se transfirió este nuevo tubo a una cama de arena a 40 °C por 15 min. Quinto, se añadió 1/2 del volumen total de 4 M NaCl, se agitó y colocó el tubo en hielo por 5 min. Sexto, se agregaron 2 volúmenes de isopropanol frío al tubo y se dejó reposar durante 1 hora a -20°C (paso 7 modificado del Anexo C). Séptimo, se centrifugó el tubo a 12000 rpm por 20 min hasta que se observó el pellet esperado (paso 8 modificado del Anexo C). Luego se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol al 75%. Octavo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min (paso 10 modificado del Anexo C), se secó el pellet en una Sorbona y se disolvió en 30 µl de agua para PCR (paso 11 modificado del Anexo C). Finalmente, se transfirió el tubo a una cama de arena a 70°C por 10 min (Rezadoost, Kordrostami, & Kumleh, 2016).

Para verificar la calidad y concentración del ADN obtenido mediante los pasos antes descritos, se cuantificó 2 µl del contenido del tubo en el NanoDrop 2000 (Anexo D), usando



como blanco el agua para PCR. Los rangos esperados para el ratio 230/260 son alrededor de 1.80, el cual indica pureza, valores muy bajos indican contaminación con proteínas o fenoles (Thermo Fisher Scientific, 2009). Asimismo, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar la integridad del ADN (Figura 2). Las muestras que presentaron ADN y buenos niveles del mismo se conservaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **6.3. Amplificación del ADN empleando marcadores microsatélites**

La PCR o reacción en cadena de la polimerasa es una técnica que permite obtener varias copias de un fragmento específico de ADN, este caso loci microsatélites, a partir de una muestra de ADN (Lodish et al., 2006). Los primers específicos para *C. odorata* y utilizados en este estudio fueron descritos por Hernández *et al.* (2008) (Anexo B). En la Tabla 1 se muestra el fluoróforo utilizado para marcar el primer *forward* de cada par de primers. Para la estandarización inicial de los primers se seleccionaron las muestras con mayor concentración y mejor calidad de ADN. Así, de las 33 muestras se escogieron 5 (18348, 18356, 18377, 18426 y COT5). De estas muestras se realizaron diluciones de ADN a una concentración final de 100 ng/ $\mu\text{l}$  con agua de PCR.

La estandarización inicial de los primers se llevó a cabo con las 5 muestras seleccionadas previamente para comprobar que las condiciones reportadas en Hernández *et al.* (2008) funcionen correctamente. Para la elaboración del máster mix de cada reacción se añadió: 21.02  $\mu\text{l}$  de agua para PCR, 3  $\mu\text{l}$  de buffer de PCR 10X (concentración final de 1X), 1.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM (concentración final de 2.5mM), 0.6  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM (concentración final de 0.2mM), 0.6  $\mu\text{l}$  de primer *forward* 10  $\mu\text{M}$  (concentración final de 0.2 $\mu\text{M}$ ), 0.6  $\mu\text{l}$  de primer *reverse* 10  $\mu\text{M}$  (concentración final de 0.2 $\mu\text{M}$ ), 0.2  $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa Platinum utilizando 1U por reacción, 0.48  $\mu\text{l}$  de BSA 1 mg/ml (concentración final de 0.016 mg/ml) y 2  $\mu\text{l}$  de ADN de cada muestra. Para los primers Ced18 y Ced61a fue necesario incrementar la concentración final de BSA a 1 mg/ml para su correcta amplificación.

Para llevar a cabo la PCR se utilizó el programa de termociclado reportado por Hernández *et al.* (2008). El programa consta de los siguientes pasos: 1) Denaturación inicial durante 1 minuto a 94°C, 2) Denaturación por 1 minuto a 94°C, 3) Annealing durante 1 minuto a 55°C, 4) Elongación durante 1 minuto a 72°C, y 5) Elongación final por 5 minutos a 72°C. El número de ciclos varió de 30 a 40 según el primer usado (Tabla 1). La amplificación de los loci microsatélites se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (Figura 3). La electroforesis se corrió durante 30 min a 100V. Los productos de PCR se conservaron en refrigeración. El tamaño esperado para cada primer se observa en el Anexo B.

#### **6.4. Determinación del genotipo de los individuos**

Los productos de PCR se transfirieron a los pocillos de las placas MicroAMP Optical, mismos que contenían individualmente un volumen total de 40 µl. Para ello, se combinaron 4 reacciones marcadas con diferentes fluoróforos. Las placas fueron transportadas a Macrogen en Corea del Sur para su genotipado. Para este propósito se utilizó el secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer de Applied Biosystems. El proceso para obtener la información genética de cada marcador e individuo, se realizó a través de electroforesis capilar, la cual permite determinar el genotipo de cada individuo para cada locus analizado.

Los resultados obtenidos en archivos con formato *.fsa* se interpretaron en el software GeneMarker (SoftGenetics LLC, 2012). Se observaron los picos de fluorescencia para cada locus amplificado, se tomó al pico observado como un alelo y se determinó de esa manera el tamaño del mismo. A continuación se elaboró una matriz alélica con los alelos obtenidos y se guardó con formato *.csv*, donde los individuos se encontraban en las filas y los locus en las columnas.

### **6.5. Análisis de diversidad genética**

Para el análisis de diversidad genética de esta investigación, se separaron de manera arbitraria los individuos de *C. odorata* colectados y analizados en laboratorio, de acuerdo a sus 3 regiones de procedencia en el Ecuador continental, Costa, Sierra y Amazonía (con 7, 8 y 18 muestras respectivamente); se realizó esta separación debido a la limitada cantidad de muestras colectadas por provincia o localidad. En el software RStudio (versión 3.6.1) se utilizaron los paquetes *adegenet* (desarrollado por Jombart, et al., 2018) y *polysat* para la obtención de los índices de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y el número de alelos por locus y por localidad. Con el paquete *poppr* se obtuvo el número de alelos privados. El paquete *hierfstat* (desarrollado por Goudet & Jombart, 2015) (Versión 0.04-22) se usó para estimar los valores  $F_{st}$  por regiones. Para el análisis de varianza molecular (AMOVA) se utilizó el paquete que igualmente está disponible para la plataforma RStudio (Excoffier, Smouse, & Quattro, 1992). Finalmente para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) por regiones se empleó el paquete *ggord* (Beck, 2007) (Versión 1.7-13).

En la rarefacción se utilizó el programa HP-Rare 1.1 (Kalinowski, 2009), usando una matriz de los alelos en un cuadro de texto. La rarefacción es una prueba estadística que permite comparar el número de alelos entre poblaciones pequeñas y grandes (Kalinowski, 2009), como las regiones Costa (7 muestras) y Amazonía (18 muestras) respectivamente en este estudio.

### **6.6. Análisis de conectividad genética poblacional**

Con el software STRUCTURE (versión 2.3.4) se analizó la estructura poblacional de todas las muestras utilizadas en este estudio, a través de la determinación de un posible número de agrupaciones genéticas mediante inferencias bayesianas. Se realizaron 2 análisis diferentes; el primero para establecer el valor de  $K$  óptimo provisional, probando valores de  $K=1$  a  $K=10$  con 10 repeticiones independientes para cada uno, con un modelo admixture, 10000 pasos de burn in y 100000 pasos de corrida de cálculos de Markov Chain y Montecarlo (MCM), sin

incluir previamente una población putativa. El segundo análisis se realizó probando un rango de  $K=1$  a  $K=8$ , con 10 repeticiones independientes de cada una, un modelo admixture, 100000 pasos de burn in y 1000000 pasos de corrida de cálculos de MCM, sin incluir previamente una población putativa. Los resultados obtenidos se analizaron en el software STRUCTURE Harvest para la determinar el valor del  $K$  óptimo (Earl & von Holdt, 2014).

Para la elaboración del gráfico final de STRUCTURE se utilizaron los programas CLUMPP y Distruct 1.1. El programa CLUMPP generó un único archivo para los 10 modelamientos obtenidos del Harvest. Mientras que el Distruct 1.1 generó los gráficos de cada  $K$  evaluado en formato *.ps*. A continuación se editó el gráfico final en el software Adobe Illustrator y se obtuvo un archivo en formato *.jpg* que muestra los resultados para este análisis (Figura 6).

## 7. Resultados

### 7.1. Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo satisfactoriamente el ADN genómico de todos los 33 individuos de *C. odorata* utilizados en esta investigación, cuyo rango de concentración fluctuó entre los 24 a 1106.3 ng/ $\mu$ l, registrando un promedio de 267.6 ng/ $\mu$ l (Anexo C) de acuerdo al NanoDrop 2000 (punto 6.2 de la Metodología). Los valores obtenidos para las relaciones de absorbancia 260/280 fueron cercanos a 2, lo cual corresponde al rango esperado. Sin embargo, la relación 260/230 presentó valores cercanos a 1 en promedio, lo cual es inferior al valor esperado. Asimismo, se observaron bandas de ADN genómico de alto peso molecular (Figura 3), es decir, estas no se encontraban fragmentadas, evidenciando la utilidad del protocolo descrito (Sección 6.2 de la Metodología) y modificado en esta investigación.

### 7.2. Amplificación y genotipado de loci microsatélites

La PCR desarrollada para este estudio (Sección 6.3 de la Metodología) fue exitosa para las 33 muestras con los 9 pares de primers específicos para *C. odorata* (Tabla 1), a excepción de las muestras COT6 con el primer Ced2 y COT1 con el primer Ced61a. Se genotipó con eficiencia el 99% de las reacciones de PCR, excepto la muestra 18348 con el primer Ced61a (Anexo E).

### 7.3. Análisis de datos

#### 7.3.1. Diversidad genética de *C. odorata* en Ecuador continental

Los 9 loci microsatélites amplificados con PCR en este estudio fueron polimórficos, generando un total de 105 alelos, un rango de 9 a 14 alelos y un promedio de 11.7 alelos por locus. Los loci más informativos fueron el Ced95, Ced41 y Ced44 con 13 alelos cada uno y

Ced61a con 14 alelos. Mientras que el locus Ced18 fue el menos informativo con 9 alelos únicamente (Tabla 2).

Los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) por locus variaron en un rango de 0.61 a 0.88 y un promedio de 0.81; en tanto que los valores de heterocigosidad observada por locus ( $H_o$ ) variaron de 0.12 a 0.61 con un promedio de 0.392 (Tabla 2). El número de alelos por región geográfica varió entre 28 y 81. La región que presentó mayor número de alelos fue la Amazonía ( $N_a=81$ ), seguido por la Costa ( $N_a=45$ ) y la Sierra ( $N_a=28$ ). El número de alelos privados para la Costa fue de 17, para la Sierra 6 y para la Amazonía 41. Los alelos privados representaron el 61% del total de alelos encontrados. Al realizar el cálculo de rarefacción (Sección 6.5 de la Metodología) se obtuvieron 45 alelos para la región Costa, 27 para la Sierra y 57 alelos para la Amazonía. En cuanto al número de alelos privados con rarefacción se obtuvieron 23 alelos para la Costa, 9 para la Sierra y 27 para la Amazonía. Si bien después de realizar el análisis de rarefacción se calculó que la Amazonía presentó una reducción considerable de alelos totales y privados, la tendencia general se mantuvo en esta región en particular, siendo la misma, la más diversa genéticamente según esta investigación (Tabla 3).

La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) por región fue 0.397 para la Costa, 0.236 para la Sierra (menor  $H_o$ ) y 0.611 para la Amazonía (mayor  $H_o$ ), mientras que la heterocigosidad observada global ( $H_o$ ; es decir, para las 3 regiones muestreadas) fue de 0.415. La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) por región fue 0.604 para la Costa (diversidad moderada), 0.348 para la Sierra (diversidad moderada baja) y 0.741 para la Amazonía (diversidad moderada alta – según Leshner, Martínez, Orduña & Hernández (2018)-. La heterocigosidad esperada global fue de 0.814, mostrando una diversidad genética alta cuando las 3 regiones son analizadas en conjunto para este valor en particular (Tabla 3).

### 7.3.2. Distribución de la diversidad, estructura y conectividad genética de *C. odorata*

El análisis de varianza molecular (AMOVA) permitió determinar que el 44 % de la variabilidad es explicada a nivel de los individuos analizados, el 31% entre las poblaciones y el 25% dentro de las poblaciones, siendo también estos porcentajes significativos de acuerdo a este mismo análisis (Tabla 6).

El resultado del análisis de coordenadas principales (PCoA) sugirió la presencia de tres posibles clústers genéticos, de acuerdo a la separación por regiones determinadas a priori para este análisis (Figura 5). El primer clúster (elipse de color rojo) de la Figura 5, corresponde exclusivamente a individuos de la Costa, el segundo clúster (elipse de color verde) se compone de individuos de la Amazonía y el tercer clúster (elipse de color azul), se compone únicamente de individuos de la Sierra. Para este análisis se excluyó el individuo 18397 de la Sierra pues se trataba de un individuo plantado. El componente principal 1 (PC1) registró el 45% de la diversidad, mientras que el componente principal 2 (PC2) contuvo el 20% de la diversidad genética aquí analizada. Por ello se puede determinar que todos los clústeres presentan una clara separación entre sí, pero la región Sierra registra el mayor distanciamiento de las otras dos regiones según este análisis (Figura 5).

Los resultados del PCoA coincidieron con los valores pairwise  $F_{st}$ , donde se encontró mayor diferenciación genética entre las regiones Sierra y Costa con un  $F_{st}$  de 0.337. Por el contrario, las regiones Costa y Amazonía presentaron una menor divergencia genética con un  $F_{st}$  de 0.114. La región Sierra y Amazonía presentaron una divergencia genética intermedia comparada con las mencionadas previamente y un valor  $F_{st}$  de 0.212 (Tabla 5). Adicionalmente, se realizó una comparación en pares del número de alelos compartidos para las 3 regiones en estudio. Las regiones Costa y Sierra compartieron 8 alelos, la Costa y la Amazonía 22 alelos y la Sierra y la Amazonía compartieron 20 alelos (Tabla 4).

Igualmente, los análisis realizados en este estudio para determinar la estructura genética poblacional de las regiones en estudio (STRUCTURE) permitieron evidenciar una tendencia similar a los patrones presentados en el PCoA y con los valores pairwise  $F_{st}$ . Como resultado de este análisis estructural se determinó que el  $K$  óptimo fue de 2 ( $\Delta K=210.47$ ) (Tabla 7), separando las 3 regiones en dos clústeres genéticos, un linaje (color verde) conformado por las regiones Costa y Amazonía y otro linaje (color azul) para el grupo de la Sierra, en este grupo se ubica el individuo sembrado 18397 correspondiente al primer linaje. Además, se incrementó el valor de  $K$  ( $K=3, 5, 7, 8$ ) y se observó que los grupos de la Costa y Amazonía presentaron subgrupos. No obstante, el grupo de la Sierra permaneció separado por completo conforme se incrementó el valor de  $K$  (Figura 6).



## 8. Discusión

### 8.1. Colección de muestras de *C. odorata* y extracción de ADN

Durante la colección de muestras de *C. odorata* se obtuvo un total 33 individuos para todos los sitios visitados en el Ecuador continental. En la región Costa se colectaron únicamente 7 muestras, número que puede ser considerado bajo pero que puede ser explicado por la fragmentación y casi inexistencia de los hábitats naturales en la región (Pinto, Pérez, Ulloa & Cuesta, 2018). Una situación similar ocurrió en la región Sierra, donde se colectaron 8 muestras de *C. odorata* en el noroccidente de la provincia de Pichincha únicamente. Dicha zona es conocida por sus actividades de agricultura principalmente, siendo la misma una amenaza para la conservación de los bosques y dificultando la colección de muestras en las pocas remanentes forestales existentes en la región (Pinto, Pérez, Ulloa & Cuesta, 2018). Por último, en la Amazonía se recogieron 18 muestras, el mayor número de colecciones para esta investigación. Al igual que en la Costa y Sierra, la Amazonía enfrenta problemas de deforestación por actividades extractivas, no obstante, presenta bosques menos fragmentados y por ende fue posible encontrar un mayor número de árboles provenientes de poblaciones naturales presentes en esta región. Cabe recalcar que 8 de estas muestras fueron colectadas en la Estación de Biodiversidad Tiputini que es una zona muy conservada dentro de la Amazonia ecuatoriana (Salvador-Van Eysenrode, Bogaert & Impens, 1998).

Para la extracción de ADN se obtuvo una media de 267.6 ng/μl en un rango de 24 a 1106.3 ng/μl según el NanoDrop 2000. Las muestras con una concentración más baja provenían de hojas consideradas “viejas”, lo cual coincide por lo reportado en otros estudios, donde el ADN extraído de hojas en senescencia fue de baja calidad y concentración (Moreira & Oliveira, 2011). Asimismo, los valores para la relación de absorbancia 260/280 fueron aproximados a 2, cercano al valor esperado de 1.80 e indicando que el ADN no contenía proteínas o fenoles

(Thermo Fisher Scientific, 2009). Por el contrario, la relación 260/230 presentó valores inferiores a 1 en promedio, alejado del rango esperado de 1.8 a 2.2, por lo cual el ADN presentaba contaminantes como guanidina, carbohidratos, sales, entre otros (Thermo Fisher Scientific, 2009; Lucena-Aguilar et al., 2016). Cabe recalcar que este bajo índice no acarrió problemas para la amplificación de las muestras durante la PCR. Las bandas de ADN genómico se mostraron íntegras en los geles de agarosa como se observa en la Figura 3, permitiendo la correcta amplificación de los loci microstélites.

## **8.2. Amplificación y genotipado de loci microsatélites**

Debido a que este estudio pudo desarrollar exitosamente protocolos específicos para la extracción de ADN de *C. odorata* con muestras del Ecuador continental, la amplificación inicial de los primers fue exitosa con la mayoría de ellos, a excepción de los primers Ced18, Ced95 y Ced61a, para los cuales fue necesario cambiar las condiciones estándares de amplificación. La concentración de BSA y el número de ciclos fueron los pasos modificados (Sección 6.3 de la Metodología y Tabla 1) en este estudio y que permitieron obtener amplicones de buena calidad para el posterior genotipado. Por una parte, la mayor concentración de BSA mejora notablemente la amplificación de ADN proveniente de muestras que contienen potenciales inhibidores como compuestos fenólicos (Farell & Alexandre, 2012). Por otra parte, un incremento en el número de ciclos produce un mayor número de copias del locus deseado, lo cual fue visible en la electroforesis en gel de agarosa y posteriormente en el genotipado de las muestras aquí analizadas (Lodish et al., 2006). De todos los 9 primers utilizados, el primer Ced61a presentó problemas recurrentes de amplificación como lo ha reportado Cavers et al. (2013).

Se amplificó con eficiencia el 99.33% de las reacciones, siendo las muestras COT1 y COT6 las únicas no amplificadas debido a la falta de ADN. La muestra 18348 pudo ser

amplificada pero no se logró genotipar, es decir, el programa GeneMarker no pudo identificar alelos de dicha muestra. Esto puede suceder por un potencial daño del fluoróforo que marca el producto de PCR durante su manipulación en laboratorio, pues son sensibles a la luz (Applied Biosystems, 2014). Por otra parte, se observó que el tamaño de los alelos encontrados (Tabla 1) no correspondió con los tamaños reportados por Hernández et al. (2008) (Anexo B), pero sí estuvo dentro de los tamaños esperados reportados por Huamán (2014), a excepción del Ced61a que no fue usado en ese estudio.

### **8.3. Diversidad genética de *C. odorata* en Ecuador continental**

Los 9 loci microsatélites desarrollados para *C. odorata* utilizados en esta investigación fueron polimórficos, como se ha reportado previamente (Hernández et al. (2008) detectaron entre 14 y 30 alelos por locus para 487 muestras), generando un total de 105 alelos para las 33 muestras y un promedio de 11.7 alelos por locus. Al igual que en estudios similares, los loci más informativos fueron el Ced95, Ced41 y Ced44 ya que presentaron la mayor cantidad de alelos por locus, con 13 alelos cada uno y 14 alelos para el locus Ced61a (Tabla 2) (Hernández et al., 2008).

Al analizar las 3 regiones de Ecuador en conjunto, la heterocigosidad esperada global fue de 0.814, lo que puede ser considerada como una diversidad genética alta para *C. odorata*. En un estudio similar pero realizado en Brasil, Huamán (2014), reportó para la misma especie un valor de 0.78 para la heterocigosidad esperada, lo cual también puede ser determinada como alta. Igualmente, investigaciones como la presente pero realizadas con otra especie maderable altamente explotada, *Swietenia macrophylla* (Meliaceae), también muestran un valor de 0.79 para la heterocigosidad esperada de este árbol, similar a lo encontrado en este estudio para *C. odorata* (Alcalá, Cruz, & Gutiérrez-Granados, 2015). Esta alta diversidad genética podría ser explicada en parte, al hecho que plantea que los árboles y arbustos son menos propensos a

perder variación genética en respuesta a la fragmentación de hábitats (como los sitios donde se realizaron las colecciones de *C. odorata* en este estudio), debido a características como longevidad o modo de polinización (Vranckx, Jacquemyn, Muys, & Honnay, 2012) que les permitiría ser resilientes a este impacto.

Al considerar el análisis realizado para cada región se señala una diversidad genética (medida con la heterocigosidad esperada) moderada para la Costa, moderada baja para la Sierra y moderada alta para la Amazonía (Tabla 3), consideraciones reportadas por Leshner, Martínez, Orduña & Hernández (2018). La baja diversidad genética registrada para la Sierra, podría deberse a una fragmentación de hábitats y deforestación frecuentes y muy marcadas, lo que se suma a una presión por la obtención de la madera, ocasionando erosión genética de esta especie en sus poblaciones naturales (Leshner, Martínez, Orduña & Hernández, 2018).

La heterocigosidad observada global ( $H_o=0.415$ ) fue inferior a la heterocigosidad esperada global ( $H_e=0.814$ ). Este resultado muestra una desviación del equilibrio Hardy-Weinberg y la posibilidad de endogamia en la especie (Sharma et al., 2016). De igual forma, la heterocigosidad observada por región fue menor que las heterocigosidades esperadas ( $H_o < H_e$ ), indicando posibles efectos de endogamia en las poblaciones, siendo la Sierra el grupo con mayor erosión genética frente a la Amazonía que presentó una diversidad genética moderada alta (Sharma et al., 2016).

#### **8.4. Distribución de la diversidad genética y estructura poblacional**

##### **8.4.1. Aislamiento genético de la Sierra**

En base a los resultados obtenidos se observó un aislamiento genético del grupo Sierra. Por un lado, el análisis de varianza molecular (AMOVA) permitió reportar que un buen porcentaje de variabilidad se ubicó entre las poblaciones (Tabla 6); y por otro, se observó que

la tercera parte de alelos en la Sierra fueron alelos privados -una cantidad alta con respecto al número total de alelos (Tabla 3)-. Igualmente, tanto los índices  $F_{st}$  (Tabla 5), como el agrupamiento del PCoA (excluido el individuo 18397 de la Figura 5) y STRUCTURE mostraron un aislamiento completo de la Sierra (Figura 6). En dicho escenario, la Sierra exhibiría una diferenciación genética alta ya que no tendría suficiente conectividad genética con las otras regiones y no podría evitar efectos de endogamia (Hoebee, 2014; Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2016). De igual modo, los valores altos de  $F_{st}$  podrían reflejar un patrón de aislamiento de largo plazo debido a barreras físicas o efectos de fragmentación de hábitats en poblaciones pequeñas como es el caso de la Sierra (Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2016). Para este grupo en particular se colectaron individuos en pastizales y con una notoria separación geográfica entre sí, razones que limitarían el flujo génico de los individuos dentro de la población y con otras poblaciones. A diferencia de este estudio, en otras investigaciones similares, se ha reportado que el 84.93% de la variación obtenida se registra dentro de las poblaciones y el 15.07% entre las poblaciones, tendencias reportadas en especies leñosas como las del Género *Cedrela* (Hamrick, Godt, & Sherman-Broyles, 1992; Huamán, 2014).

Con el fin de explicar este aislamiento genético de *C. odorata*, se revisaron los datos biogeográficos de las colecciones de este estudio, como por ejemplo los datos de altitud de las muestras colectadas. En general, las muestras de la Costa y Amazonía fueron colectadas a una altura de 309 m.s.n.m en promedio, mientras que el grupo de la Sierra fue colectado por encima de los 500 m.s.n.m., con un promedio de 723 m.s.n.m. La similitud en el rango de distribución altitudinal de *C. odorata* entre la Costa y Amazonia, y la diferenciación de este patrón con las poblaciones de la Sierra registradas y colectadas a mayor altura, podría explicar el mayor flujo génico entre estas dos primeras regiones mencionadas, pese a la presencia de la Cordillera de los Andes (Shi, Michalski, Chen, & Durka, 2011). Este tipo de diferenciación genética por

barreras altitudinales ha sido reportada para otras especies silvestres como *Vaccinium floribundum*, Ericaceae que también son registradas en el Ecuador (Vega, 2019).

De manera paralela a este estudio, y como parte de un proyecto en marcha que busca entender entre otras cosas este posible aislamiento genético de los individuos de *C. odorata* presentes en la Sierra, se realizó un análisis morfológico más exhaustivo (llevado a cabo por el especialista en Meliaceae Walter Palacios), mismo que preliminarmente concluyó que los individuos de esta región Andina serían parte de una población correspondiente a una nueva especie denominada provisionalmente como “*Cedrela angusticarpa*” (Palacios, en prep.). Como sustento para esta hipótesis, en el Género *Cedrela* se ha discutido y confirmado que diferentes identidades genéticas coinciden con la divergencia morfológica de ciertos taxones diferenciables en este Género, apoyando la hipótesis de esta potencial nueva especie para el Ecuador (Muellner, Pennington, & Chase, 2009). No obstante, este estudio se realizó con marcadores microsatélites que quizá no son los más apropiados para este tipo de conclusiones, pero son un primer paso para determinar potenciales divergencias a nivel de especies (Shi, Michalski, Chen, & Durka, 2011). Para determinar si efectivamente el grupo de la Sierra pertenece a una especie distinta de *Cedrela*, se puede analizar el genoma de los cloroplastos de los individuos colectados en esta investigación, el cual ayudaría a identificar las diferentes relaciones evolutivas de las especies dentro de este grupo (Song et al., 2017). Análisis similares han sido desarrollados en otros taxones (por ejemplo *Paris* spp.; Melanthiaceae), cuya identificación morfológica entre especies al igual que en *Cedrela*, es significativamente complicada (Song et al., 2017). Otro soporte para defender la hipótesis de una posible nueva especie sería el alto porcentaje de variación entre las poblaciones (Tabla 6), contrario a lo registrado para especies de las características de *C. odorata* (Hamrick, Godt, & Sherman-Broyles, 1992) y que fue registrada en este estudio.

#### 8.4.2. Conectividad genética entre Costa y Amazonía

Según los resultados aquí obtenidos, la Amazonía y la Costa presentaron una moderada diferenciación genética entre sí, indicando un limitado flujo génico entre las dos regiones (Hoebee, 2014; Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2016). Este resultado fue apoyado con el análisis de STRUCTURE, mismo que presentó los mismos patrones obtenidos en el PCoA y el pairwise  $F_{st}$  (mismo linaje para Costa y Amazonía. Figura 5 y Tabla 5 respectivamente). Asimismo, se observó que las dos regiones mantuvieron el mayor número de alelos compartidos (Tabla 4) a diferencia de lo que ocurrió con los individuos de la región Sierra.

La conexión genética entre Costa y Amazonía registrada en este estudio, fue de cierta manera inesperada puesto que la Cordillera de los Andes se ubica geográficamente en medio de las dos regiones, barrera física que limitaría el flujo génico entre ellas. Investigaciones previas en especies maderables como *Buchenavia oxycarpa* (Combretaceae) han puesto en evidencia que incluso “pequeñas” barreras físicas (como el Río Negro en Brasil) puede causar una importante separación genética (Nazareno, Dick, & Lohmann, 2019) entre poblaciones de árboles tropicales. Es por ello que se sugiere como siguiente paso a esta investigación, indagar los procesos que (explicarían estos resultados) y que permitieron (si estos son eventos geológicamente pasados) o han permitido mantener una posible conexión genética entre estas regiones relativamente distantes y geográficamente separadas.

#### 8.5. Medidas de manejo de *C. odorata*

La información genética aquí recopilada puede también ayudar a tomar medidas de manejo adecuadas para *C. odorata*, asegurando su conservación y sentando un precedente para otras especies maderables amenazadas como *S. macrophylla*. Por ejemplo, de confirmarse que el grupo de la Sierra es otra especie dentro del Género *Cedrela*, se debe evitar la explotación maderera completamente para esta población puesto que esta sería pequeña (probablemente

con una alta endogamia) y se perderían alelos únicos de este grupo si se continúa con su tala y uso sin control (Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2016). En contraste, en la Amazonía (zona con la mayor diversidad genética) se podría abrir un cupo limitado de extracción de madera de *C. odorata*, sin que afecte considerablemente a sus poblaciones (Ottewell, Bickerton, Byrne, & Lowe, 2016), previo a un estudio más exhaustivo que determine si es factible su extracción en esta región relativamente bien conservada. Este estudio en conjunto con otros podrían evaluar la efectividad de la especie para ser manejada en viveros y ser utilizada para reforestación (Mostacedo & Fredericksen, 2001) ya que se ha reportado que la supervivencia de las semillas en viveros para esta especie es superior al 90% (Morales & Herrera, s/f.). La genética es una importante fuente de información que al ser usada en conjunto con otros aspectos (ecológicos o biogeográficos) permitirían la correcta implementación de planes de manejo para una de las especies maderables más importantes nivel local y regional.



## 9. Conclusiones

Las poblaciones de *C. odorata* en el Ecuador continental presentaron una diversidad genética diferenciada para cada región, siendo la Amazonía la zona con una diversidad genética moderada alta, la Costa con una diversidad moderada y la Sierra con una diversidad genética moderada baja.

Se encontró una estructura poblacional definida para todas las poblaciones estudiadas. La presencia de dos linajes destaca del estudio, agrupando a la Amazonía y Costa, y otro grupo exclusivo para la Sierra.

Posiblemente el aislamiento genético del grupo de la Sierra corresponda a una nueva especie, cuya especiación pudo ser promovida por las barreras físicas (e.j altitud) que han impedido el flujo génico entre los individuos de distintas poblaciones dentro del Género *Cedrela*.

Este trabajo provee información genética que ayuda en la implementación de medidas de conservación de *C. odorata*, una especie altamente amenazada por la explotación maderera.

## 10. Recomendaciones

Ampliar el rango de muestreo a otras zonas del Ecuador, pues se han reportado poblaciones de *C. odorata* en zonas como Cerro Blanco en Guayas, donde no se realizaron colecciones para este estudio. Igualmente, se debe hacer énfasis en muestrear las pocas poblaciones naturales de *C. odorata* en otras zonas del Ecuador.

Realizar análisis genéticos más exhaustivos y adicionales, como el secuenciamiento del genoma de cloroplastos de esta especie, principalmente para individuos de la Sierra, y comprobar que efectivamente es un taxón diferente de *Cedrela* en esa región. También se recomienda realizar este tipo de análisis genéticos más completos, con individuos de otras regiones y especies de *Cedrela* para entender la historia evolutiva del género en el país y en toda su área de distribución.

Usar este estudio como base para la investigación genética de *C. odorata* en Galápagos, donde es una especie invasora que afecta la flora endémica de las islas.

## 11. Referencias Bibliográficas

- Alcalá, R. E., Cruz, S. D. la, & Gutiérrez-Granados, G. (2015). Genetic structure and genetic diversity of *Swietenia macrophylla* in areas subjected to selective logging in Quintana Roo, Mexico. *Botanical Sciences*, 93(4), 819-828. <https://doi.org/10.17129/botsci.256>
- Applied Biosystems. (2014). DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. Obtenido el 8 de diciembre de 2019 de <http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/4474504.pdf>
- Beck, M. (2017). Ggord: Ordination Plots with ggplot2. R package version 1.0.0. <https://zenodo.org/badge/latestdoi/35334615>
- Cavers, S., Telford, A., Cruz, F. A., Castañeda, A. J. P., Valencia, R., Navarro, C., Vendramin, G. G. (2013). Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography*, 40(4), 732-746. <https://doi.org/10.1111/jbi.12086>
- Chase, M. R., Boshier, D. H., & Bawa, K. S. (1995). Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *American Journal of Botany*, 82(4), 468-475. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1995.tb15666.x>
- Dodson, C. H., & Gentry, A. H. (1991). Biological Extinction in Western Ecuador. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 78(2), 273-295. <https://doi.org/10.2307/2399563>
- Dray, S. et al. (2018). Package ‘ade4’ (Versión 1.7-13) [Software]. Obtenido el 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ade4/ade4.pdf>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479–491.
- Farell, E. M., & Alexandre, G. (2012). Bovine serum albumin further enhances the effects of organic solvents on increased yield of polymerase chain reaction of GC-rich templates. *BMC Research Notes*, 5, 257. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-257>
- Goudet, J. & Jombart, T. (2015). Package ‘hierfstat’ (Versión 0.04-22) [Software]. Obtenido el 14 de mayo 2017 de <https://cran.r-project.org/web/packages/hierfstat/index.html>
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., Suzuki, D. T., Lewontin, R. C., & Gelbart, W. M. (2000). Mapping with molecular markers. *An Introduction to Genetic Analysis. 7th Edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21962/>
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. En W. T. Adams, S. H. Strauss, D. L. Copes, & A. R. Griffin (Eds.), *Population Genetics of Forest Trees: Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees Corvallis, Oregon, U.S.A., July 31–August 2, 1990* (pp. 95-124). [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2815-5\\_7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2815-5_7)
- Hernández, G., Buonamici, A., Walker, K., Vendramin, G. G., Navarro, C., & Cavers, S. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. *Conservation Genetics*, 9(2), 457-459. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9334-y>
- Hoebee, S. (2014). Is there a consensus on what constitutes a high and low value of FST in population genetics? Recuperado 11 de diciembre de 2019, de ResearchGate website: [https://www.researchgate.net/post/Is\\_there\\_a\\_consensus\\_on\\_what\\_constitutes\\_a\\_high\\_and\\_low\\_value\\_of\\_FST\\_in\\_population\\_genetics](https://www.researchgate.net/post/Is_there_a_consensus_on_what_constitutes_a_high_and_low_value_of_FST_in_population_genetics)

- Huamán, A. (2014). *Structure and genetic diversity of Cedrela (Meliaceae) on the upper Parana River*. (Tesis de Maestría).
- Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T. J., Underwood, N., & Vellend, M. (2008). Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, *11*(6), 609-623. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x>
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *23*(14), 1801–1806. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>
- Jombart, T. et al. (2018). Package ‘adegenet’ (Versión 2.1.1) [Software]. Obtenido el 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/adegenet/adegenet.pdf>
- Kalinowski, S. (2009). HP-Rare 1.1. [Software]. Obtenido el 8 de diciembre de 2019 de <http://www.montana.edu/kalinowski/software/hp-rare.html>
- Keenan, K. (2017). Package ‘diveRsity’ (Versión 0.04-22) [Software]. Recuperado 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/diveRsity/diveRsity.pdf>
- León-Yáñez, S. et al. (2012). *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Leshner, J. M., Martínez, J. L., Orduña, P. & Hernández, A. (2018). Diversidad genética del cedro rojo (*Cedrela odorata*) en el estado de Tabasco, México. *Bosque (Valdivia)*, *39*(3), 411-417. <https://doi.org/10.4067/S0717-92002018000300411>
- Lodish, H. et al. (2006). *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, *14*(4), 264-270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

- Luebert, F., & Weigend, M. (2014). Phylogenetic insights into Andean plant diversification. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2. <https://doi.org/10.3389/fevo.2014.00027>
- Mark, J. & Rivers, M.C. 2017. *Cedrela odorata*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2017. Obtenido el 10 de diciembre de 2019 de <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T32292A68080590.en>.
- Mejía, E. & Pacheco, P. (2013). *Aprovechamiento forestal y mercados de la madera en la Amazonía ecuatoriana*. Bogor: CIFOR:
- Morales, E. & Herrera, L. (s/f). *CEDRO (Cedrela odorata L.) Protocolo para su Colecta, Beneficio y Almacenaje*. Obtenido el 10 de diciembre de 2019 de <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/19/1299Cedro%20rojo%20Yucat%c3%a1n.pdf>
- Moreira, P. A., & Oliveira, D. A. (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 10(1), 353-358. <https://doi.org/10.4238/vol10-1gmr1030>
- Mostacedo, B. & Fredericksen, T. (2001). *Regeneración y silvicultura de bosques tropicales en Bolivia*. Santa Cruz: El País.
- Muellner, A. N., Pennington, T. D., & Chase, M. W. (2009). Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of “*Cedrela odorata*”. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2), 461-469. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.03.025>
- Muñoz, L. (2015). «Acuerdo Ministerial que estableció la veda para Cedro y Caoba en el año 2007». *El blog Forestal*. Recuperado 28 de diciembre de 2019 de <https://mluisforestal.wordpress.com/2015/11/24/comparto-acuerdo-ministerial-que-establecio-la-veda-para-cedro-y-caoba-en-el-ano-2007/>

- Ottewell, K. M., Bickerton, D. C., Byrne, M., & Lowe, A. J. (2016). Bridging the gap: A genetic assessment framework for population-level threatened plant conservation prioritization and decision-making. *Diversity and Distributions*, 22(2), 174-188. <https://doi.org/10.1111/ddi.12387>
- Palacios, W. A., & Jaramillo, N. (2016). Árboles amenazados del Chocó ecuatoriano. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 8(14). <https://doi.org/10.18272/aci.v8i1.508>
- Paradis, E. et al. (2017a). Package ‘ape’ (Versión 4.1) [Software]. Recuperado 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf>
- Paradis, E. et al. (2017b). Package ‘pegas’ (Versión 0.10) [Software]. Recuperado 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ape/ape.pdf>
- Pennington, R. T., Lavin, M., Särkinen, T., Lewis, G. P., Klitgaard, B. B., & Hughes, C. E. (2010). Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(31), 13783-13787. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001317107>
- Pennington, T. D., Muellner, A. N., & Wise, R. (2010). *A Monograph of Cedrela (Meliaceae)*. DH: Books.
- Pinto, E., Pérez, A., Ulloa, C. & Cuesta, F. (2018). Árboles representativos de los bosques montanos del Noroccidente de Pichincha, Ecuador. Quito: CONDESAN.
- Pritchard, J. (1998). STRUCTURE (Versión 2.3.4) [Software]. Stanford University.
- Rezadoost, M. H., Kordrostami, M., & Kumleh, H. H. (2016). An efficient protocol for isolation of inhibitor-free nucleic acids even from recalcitrant plants. *3 Biotech*, 6(1), 61. doi: 10.1007/s13205-016-0375-0
- Rosenberg, N. A. (2004). Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>

- RStudio Team. (2019). RStudio: Integrated Development for R (Versión 3.4.2) [Software].  
RStudio, Inc. Obtenido el 8 de diciembre de 2019 de <https://cran.rproject.org/bin/windows/base/>
- Salvador-Van Eysenrode, D., Bogaert, J. & Impens, I. (1998). Horizontal canopy gap occlusion at the Tiputini Biodiversity Station, Amazonian Ecuador. *Selbyana* 19(2): 297.
- Sharma, R., Kumar, B., Arora, R., Ahlawat, S., Mishra, A. K., & Tantia, M. S. (2016). Genetic diversity estimates point to immediate efforts for conserving the endangered Tibetan sheep of India. *Meta Gene*, 8, 14-20. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2016.01.002>
- Shi, M.-M., Michalski, S. G., Chen, X.-Y., & Durka, W. (2011). Isolation by Elevation: Genetic Structure at Neutral and Putatively Non-Neutral Loci in a Dominant Tree of Subtropical Forests, *Castanopsis eyrei*. *PLOS ONE*, 6(6), e21302. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021302>
- SoftGenetics LLC. (2012). Software GeneMarker ® [Software]
- Song, Y., Wang, S., Ding, Y., Xu, J., Li, M. F., Zhu, S., & Chen, N. (2017). Chloroplast Genomic Resource of Paris for Species Discrimination. *Scientific Reports*, 7(1), 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02083-7>
- Thermo Fisher Scientific. (2009). NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual.
- Vega, P. (2019). *Estudio de la diversidad genética y estructura poblacional del mortiño (Vaccinium floribundum Kunth.) en la sierra ecuatoriana.* (Tesis de grado).
- Vergara, V. (2019). Ecuador propone al cedro en lista de especies protegidas. Recuperado 18 de diciembre de 2019 de EcuadorTV website: <https://www.ecuadortv.ec/noticias/actualidad/ecuador-cedro-especies-protegidas>
- Vranckx, G., Jacquemyn, H., Muys, B., & Honnay, O. (2012). Meta-Analysis of Susceptibility of Woody Plants to Loss of Genetic Diversity through Habitat Fragmentation.



*Conservation Biology*, 26(2), 228-237. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2011.01778.x>

Whickham, W. & Chang, W. (2017). Package ‘ggplot2’ (Versión 2.2.1) [Software]. Recuperado 18 de diciembre de 2019 de <https://cran.r-project.org/web/packages/ggplot2/ggplot2.pdf>

Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., & Lam, T. T.-Y. (2017). Ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(1), 28–36. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12628>

## 12. Tablas

**Tabla 1.** Loci microsatélites empleados como marcadores moleculares en este estudio, los fluoróforos asignados, la temperatura de annealing, el número de ciclos del termociclado y el rango de tamaño de los alelos encontrados en pares de bases de cada locus.

<b>Primer</b>	<b>Fluoróforos asignados</b>	<b>Temp. Annealing</b>	<b>Ciclos termociclador</b>	<b>Rango tamaño de alelos encontrados (pb)</b>
<b>Ced2</b>	PET	55	30	123-175
<b>Ced18</b>	VIC	55	35	118-152
<b>Ced131</b>	6FAM	55	30	76-106
<b>Ced65</b>	NED	55	30	162-188
<b>Ced95</b>	6FAM	55	35	172-244
<b>Ced44</b>	PET	55	30	157-211
<b>Ced54</b>	NED	55	30	181-211
<b>Ced41</b>	VIC	55	30	115-153
<b>Ced61a</b>	6FAM	51	35-40	247-285

**Tabla 2.** Resumen de la información proporcionada por 9 marcadores SSR para la caracterización genética de *C. odorata* en el Ecuador continental.

<b>Locus</b>	<b>Na</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>
<b>Ced2</b>	11	0.34	0.82
<b>Ced18</b>	9	0.12	0.61
<b>Ced131</b>	10	0.45	0.86
<b>Ced65</b>	12	0.61	0.88
<b>Ced95</b>	13	0.42	0.87
<b>Ced44</b>	13	0.48	0.86
<b>Ced54</b>	10	0.45	0.79
<b>Ced41</b>	13	0.52	0.83
<b>Ced61a</b>	14	0.32	0.88

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

**Tabla 3.** Resumen de los parámetros de diversidad genética para cada región en donde se recolectaron individuos de *C. odorata*.

<b>Región</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>NaR</b>	<b>Npa</b>	<b>NpaR</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>
<b>Costa</b>	7	45	45	17	23	0.397	0.604
<b>Sierra</b>	8	28	27	6	9	0.236	0.348
<b>Amazonía</b>	18	81	57	41	27	0.611	0.741

N: número de individuos en la región; Na: número de alelos por región; NaR: número de alelos por región con rarefacción; Npa: número de alelos privados por región; NpaR: número de alelos por región con rarefacción; Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada.

**Tabla 4.** Pairwise de alelos compartidos en las tres regiones de *C. odorata* estudiadas.

	<b>Costa</b>	<b>Sierra</b>	<b>Amazonía</b>
<b>Costa</b>	-	8	22
<b>Sierra</b>	8	-	20
<b>Amazonía</b>	22	20	-

**Tabla 5.** Comparación de los valores pairwise Fst entre las tres regiones analizadas.

	<b>Costa</b>	<b>Sierra</b>	<b>Amazonía</b>
<b>Costa</b>	-	0.337	0.114
<b>Sierra</b>	0.337	-	0.212
<b>Amazonía</b>	0.114	0.212	-

**Tabla 6.** Resultados del AMOVA realizado para las muestras de *C. odorata* de las tres regiones en estudio.

Fuente de variación	Porcentaje	p-value
Dentro de los individuos	44%	0.001
Entre las poblaciones	31%	0.001
Dentro de las poblaciones	25%	0.001

**Tabla 7.** Valores para estimación del K óptimo a partir del análisis en STRUCTURE con información previa de las regiones de origen de las muestras de *C. odorata*.

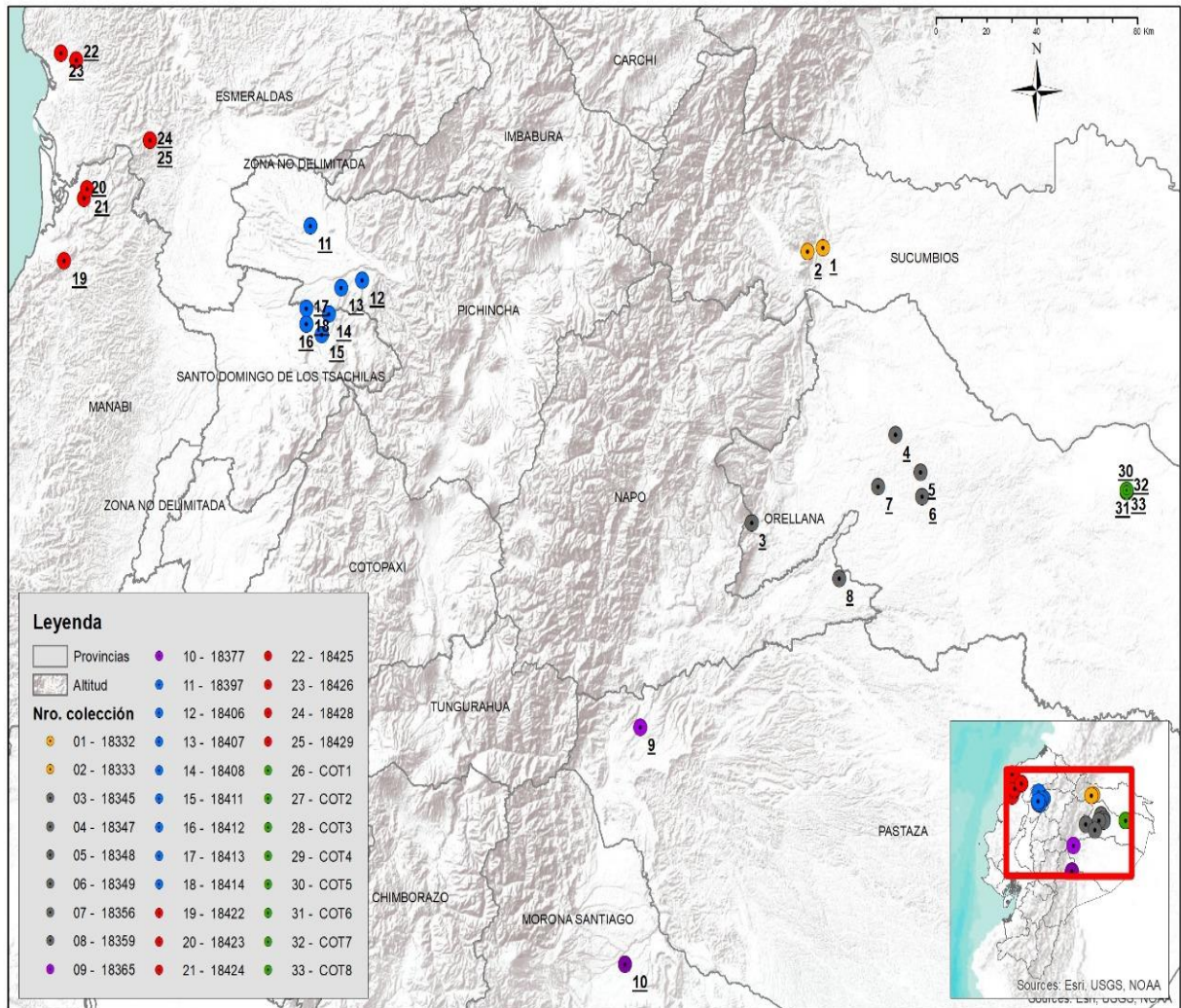
K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	Ln''(K)	Delta K
2	10	-9.219.100	0.5820	229.670.000	122.504.444	210.47
3	10	-8.147.444	34.950	107.165.556	88.801.111	25.40
5	10	7.424.300	162.369	53.950.000	49.290.000	3.04
7	10	-7.228.000	316.452	14.970.000	27.781.111	0.88
8	10	-7.356.111	107.313	-12.811.111	NA	NA

K: número de clústers evaluados; Reps: número de repeticiones corridas; Mean LnP(K): promedio del logaritmo natural de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Stdev LnP(K): desviación estándar del logaritmo natural de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Ln'(K): derivada de primer orden de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Ln''(K): derivada de segundo orden de la probabilidad de los datos para cada valor de K; Delta K: tasa de cambio del logaritmo de la probabilidad de los datos.

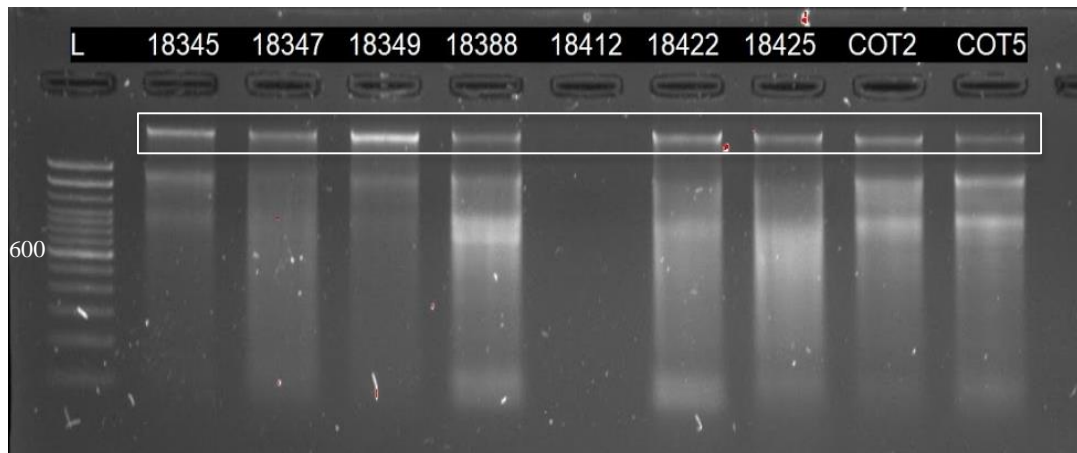
### 13. Figuras



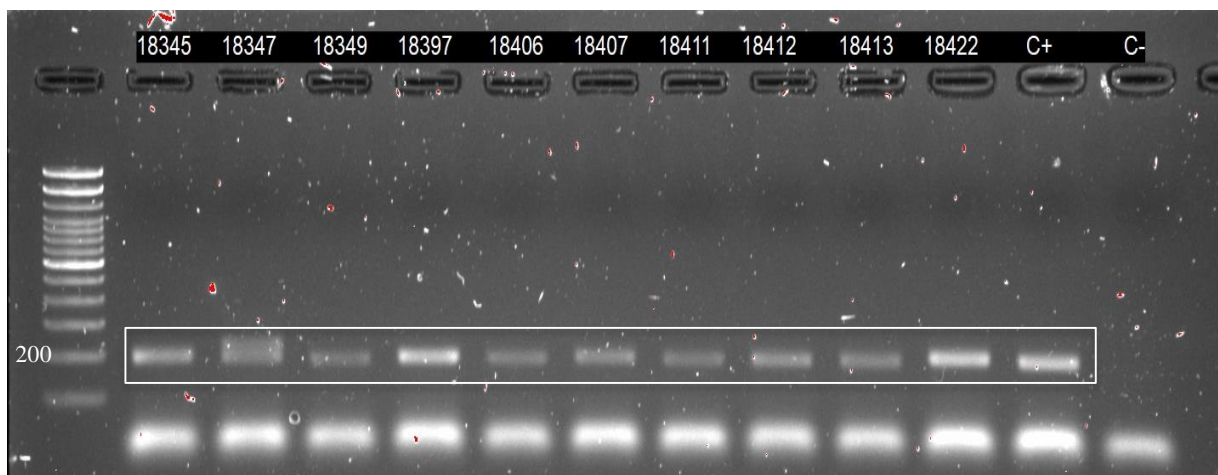
**Figura 1.** Individuos de *C. odorata* colectados para el estudio. En la primera imagen (izquierda) se observan las hojas. En la segunda imagen (derecha) se observan los frutos. Fotos: Walter Palacios.



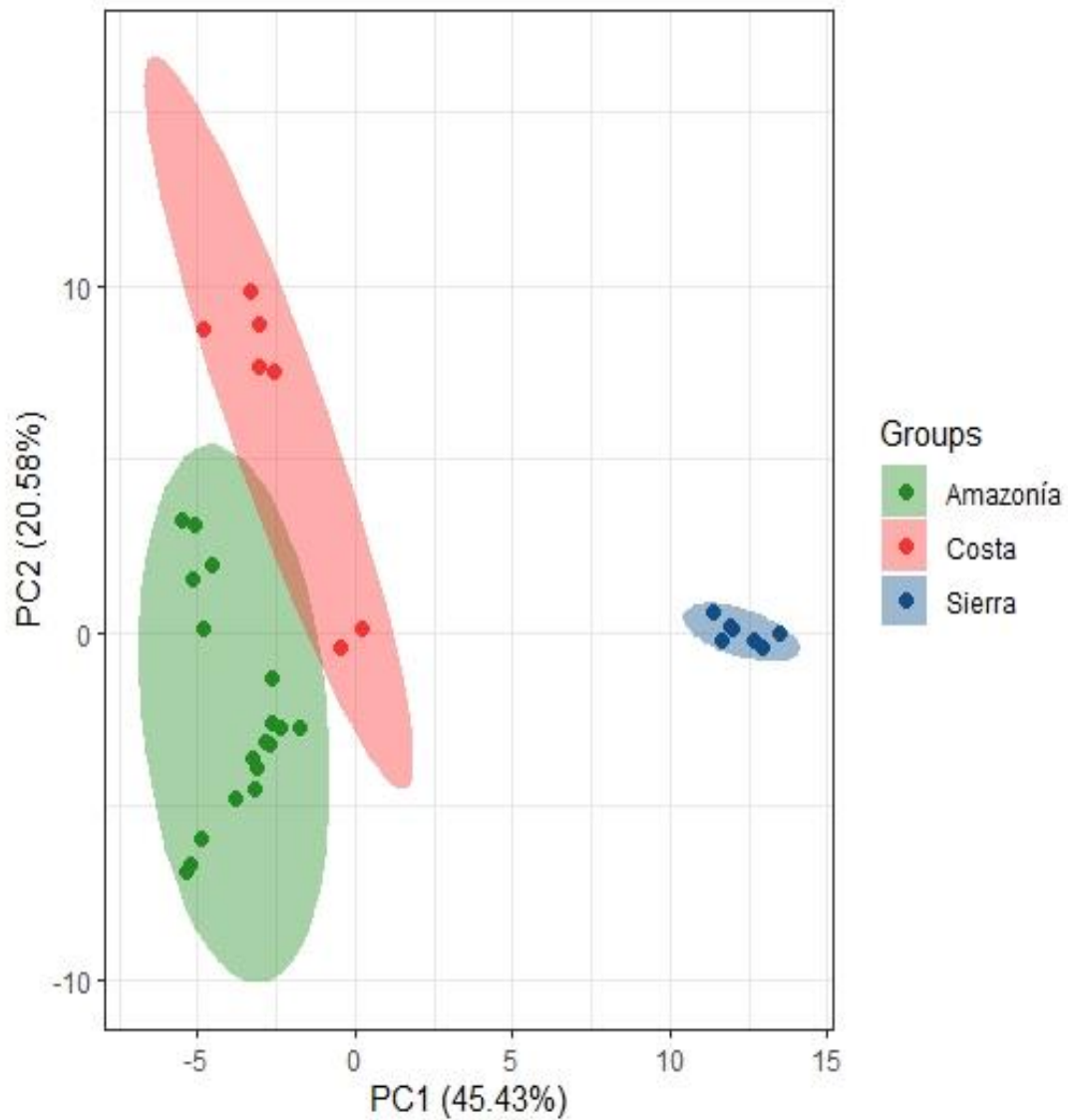
**Figura 2.** Mapa georreferenciado de las 33 muestras colectadas en las 3 regiones de Ecuador continental analizadas en este estudio. Mapa elaborado por Esteban Rivera.



**Figura 3.** Electroforesis en gel agarosa al 1% del ADN extraído a partir de hojas de *C. odorata*. Dentro del cuadro blanco se observan bandas de ADN de alto peso molecular en todas las muestras, a excepción de la muestras 18412. L: ladder de 100 bp (Invitrogen).

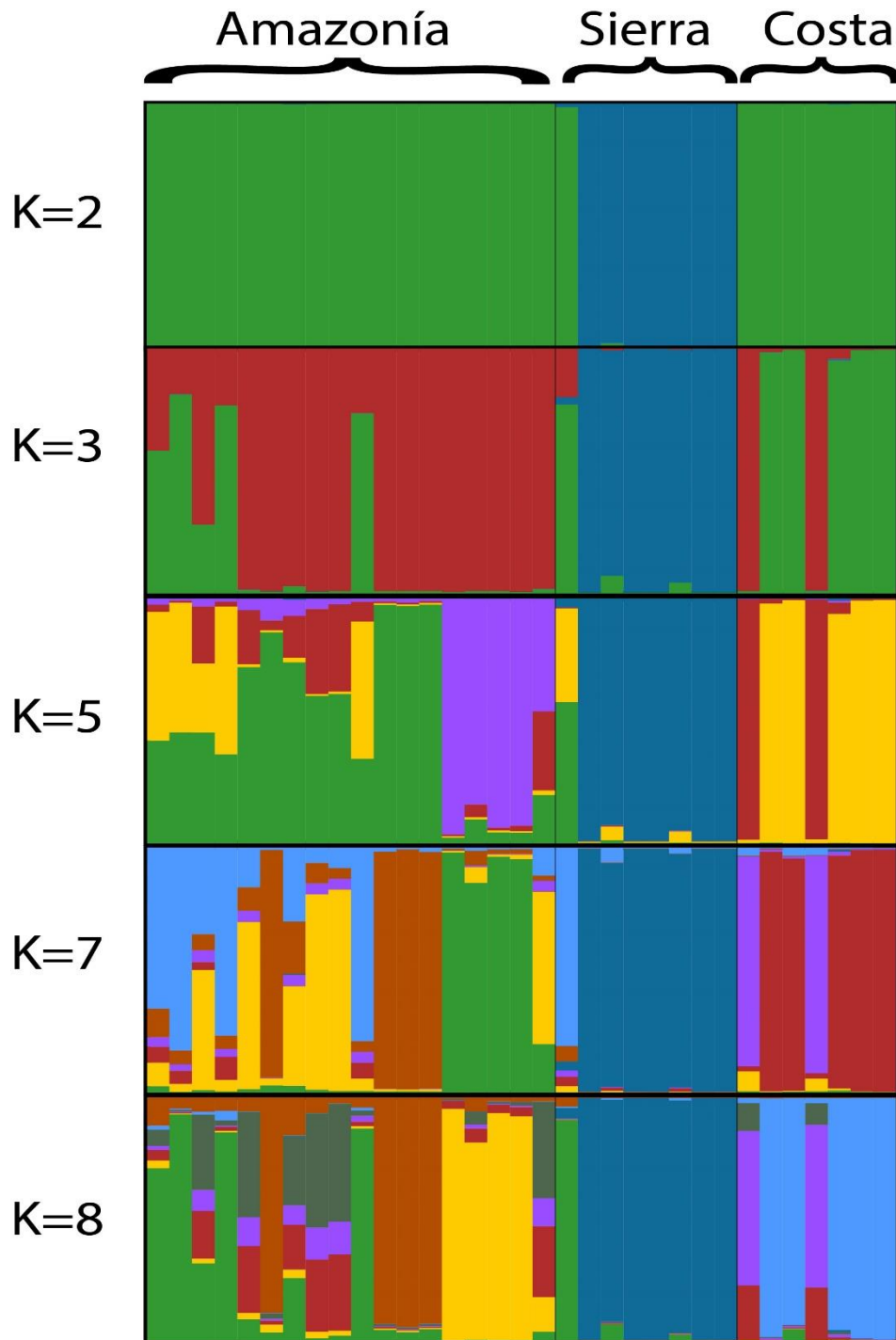


**Figura 4.** Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de los productos de PCR de 9 muestras con el primer Ced54. Dentro del cuadro blanco se observan los productos de PCR cercano a 200 pb correspondiente al tamaño esperado.



**Figura 5.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) bidimensional, de 33 individuos de *C. odorata* utilizando datos de diversidad genética de 9 marcadores SSR. Se sugieren 3 posibles clústeres genéticos que están representados en color rojo (individuos de la Costa ecuatoriana), verde (individuos de la Amazonía) y azul (individuos de la Sierra). Se excluyó el individuo 18397 pues era un individuo plantado.





**Figura 6.** Resultados de STRUCTURE considerando los 33 individuos muestreados en Ecuador continental agrupados en 3 regiones. Las poblaciones están etiquetadas encima de la figura con número. Se considera el valor óptimo de  $K=2$  ( $\Delta K=210.47$ ). Se considera el segundo mejor valor  $K=3$  ( $\Delta K=25.41$ ). Se considera el tercer mejor valor  $K=5$  ( $\Delta K=3.04$ ).  $K=7$  ( $\Delta K=0.88$ ).  $K=8$ .

## 14. Anexos

**Anexo A.** Provincias donde se colectaron los 33 individuos colectados de *C. odorata* para este estudio.

<b>Provincia</b>	<b>Individuo</b>	<b>Coordenadas</b>	<b>Altitud*</b>
<b>Sucumbíos</b>	18332	0250727 0008161	389
	18333	0244570 0006888	470
<b>Orellana</b>	18345	222337 9919173	688
	18347	0279556 9947806	239
	18348	0289552 9935728	258
	18349	0290208 9927852	276
	18356	0272738 9931023	333
	18359	0257178 9901303	352
	COT1	S0° 38.339' W76° 09.308'	215
	COT2	S0° 38.338' W76° 09.307'	211
	COT3	S0° 38.344' W76° 09.303'	210
	COT4	S0° 38.094' W76° 09.298'	208
COT5	S0° 38.083' W76° 09.322'	229	
COT6	S0° 38.080' W76° 09.323'	230	
COT7	S0° 38.085' W76° 09.319'	231	
COT8	S0° 38.085' W76° 09.319'	230	
<b>Pastaza</b>	18365	0178105 9853195	1012
<b>Morona Santiago</b>	18377	0172105 9776426	975
<b>Pichincha</b>	18397	0714811 0015201	505

	18406	0735277 9997635	1191
	18407	0727017 9995200	857
	18408	0722114 9986810	698
	18411	0719186 9980201	751
	18412	0713009 9983461	581
	18413	0713063 9983458	587
	18414	0713189 9988666	614
<b>Manabí</b>	18422	0616720 0003962	261
	18423	0624519 0024235	10
<b>Esmeraldas</b>	18424	0625879 0027171	6
	18425	0621544 0068863	18
	18426	0615508 0710333	18
	18428	0650879 0042947	333
	18429	0650879 0042947	333

\*Altitud en metros sobre el nivel del mar.

**Anexo B.** Secuencias de los 9 pares de primers (*forward* y *reverse*) con los que se amplificaron los loci microsatélites analizados en este trabajo y los tamaños esperados en pares de bases.

<b>Locus</b>	<b>Primer <i>Forward</i> y <i>Reverse</i></b>	<b>Rango de tamaño esperado</b>
<b>Ced2</b>	F: TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R: AACTTTCGAATTGGTTAAGG	130-170 pb
<b>Ced18</b>	F: CAAAGACCAAGATTTGATGC R: ACTATGGGTGGCACAACACTAC	130-150 pb
<b>Ced131</b>	F: CTCGTAATAATCCCATTCCA R: GGAGATATTTTTGGGGTTTT	80-120 pb
<b>Ced65</b>	F: GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R: GAGGTTCGATCAGGTCTTGG	160-200 pb
<b>Ced95</b>	F: ATTTTCATTCCTTTTAGCC R: TTATCATCTCCCTCACTCCA	190-250 pb
<b>Ced44</b>	F: ACTCCATTAAGTCCATGAA R: ATTTTCATTCCTTTTAGCC	180-240 pb
<b>Ced54</b>	F: GATCTCACCCACTTGAAAAA R: GCTCATATTTGAGAGGCATT	120-160 pb
<b>Ced41</b>	F: TCATTCTTGGATCCTGCTAT R: GTGGGAAAGATTGTGAAGAA	120-160 pb
<b>Ced61a</b>	F: CAATCAAACCAAAAATGGAT R: GCAAATTAACCAGAAAAACG	240-270 pb

**Anexo C.** Protocolo de extracción de ADN sin modificaciones para muestras recalcitrantes.**Buffers**

*Buffer 1:* 200 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 0.5 % (v/v) Triton X-100, 3 % (w/v) CTAB, 0.1 % (w/v) PVP (agregar sólo antes de usar).

*Buffer 2:* 50 mM Tris-HCl, 2 M tiocianato de guanidina, 0.2 % (v/v) mercaptoetanol (agregar sólo antes de usar), 0.2 mg/ml Proteinasa K (agregar sólo antes de usar).

**Reactivos**

4 M NaCl

**Aislamiento de ADN**

1. Colocar 50 mg de tejido vegetal en un tubo de 2 ml.
2. Agregar 400  $\mu$ l de Buffer 1 y 0.1 % (w/v) PVP, vortex por 20 s y transferir el tubo a una cama de arena a 60 °C por 30 min.
3. Añadir 400  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1, v/v) y agitar fuertemente por 2 min.
4. Centrifugar el tubo por 15 min a 10000 rpm.
5. Transferir 300  $\mu$ l de sobrenadante a un tubo nuevo de 2 ml, agregar 1/2 volumen Buffer 2 y transferir el tubo a una cama de arena a 40 °C por 15 min.
6. Añadir 1/2 del volumen total de 4 M NaCl, agitar y colocar el tubo en hielo por 5 min.
7. Agregar 2 volúmenes de isopropanol frío y dejar reposar a temperatura ambiente por 2 min.
8. Centrifugar a 8000 rpm por 15 min (el pellet debe verse).
9. Descartar el sobrenadante.
10. Lavar el pellet con etanol 75 % (v/v) (agregar etanol despacio y mantener por 2 min a temperatura ambiente, no revolver, y centrifugar a 8000 rpm durante 2 min).
11. Secar el pellet y disolver en 100  $\mu$ L de buffer TE.
12. Transferir el tubo que contiene el ADN a una cama de arena a 70 °C por 10 min.

**Anexo D.** Cuantificación en el NanoDrop 2000 de las 33 muestras de *C.odorata* empleadas en este estudio.

<b>Muestra</b>	<b>Ácido nucleico (ng/μl)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
18332	32.1	1.89	0.55
18333	203.5	2.05	0.95
18345	37.6	1.90	0.91
18347	111.4	2.01	0.85
18348	696.8	2.09	1.59
18349	32.8	2.01	0.21
18356	1106.3	2.05	1.98
18359	598.6	2.04	0.91
18365	544.6	2.07	0.60
18377	894.5	2.00	1.79
18397	120.7	1.97	0.78
18406	22.4	1.96	0.14
18407	24.7	1.73	0.47
18408	328.1	2.05	1.45
18411	24.9	1.83	0.10
18412	24.0	1.94	0.11
18413	224	1.25	0.16
18414	313.0	2.03	1.30
18422	116.6	2.06	0.65
18423	312.5	1.70	0.08
18424	30.6	2.05	0.32
18425	183.3	2.01	0.64
18426	832.6	2.00	1.08
18428	391.3	1.99	0.85
18429	1017.7	2.05	1.23
COT1	45.9	2.18	0.29
COT2	73.0	1.96	0.29
COT3	207.3	2.07	0.68
COT4	62.9	2.01	1.05
COT5	450.6	2.03	1.05
COT6	108.3	2.02	0.78
COT7	144.0	2.04	0.68
COT8	25.3	2.22	0.06

**Anexo E.** Matriz de alelos de las 33 muestras con los 9 primers empleados en este estudio.

<b>Muestra</b>	<b>Ced131</b>	<b>Ced18</b>	<b>Ced2</b>	<b>Ced65</b>	<b>Ced95</b>	<b>Ced44</b>	<b>Ced41</b>	<b>Ced54</b>	<b>Ced61a</b>
18332	98/98	120/120	123/123	164/176	188/200	175/185	119/121	181/187	251/251
18333	78/98	120/120	141/141	164/172	190/190	177/177	121/121	185/187	251/251
18345	78/98	120/120	123/169	164/176	188/194	175/181	123/129	187/193	273/273
18347	82/98	120/120	123/141	164/174	188/190	175/177	121/125	187/187	273/273
18348	78/78	120/120	139/141	176/180	194/200	181/187	121/133	185/197	0
18349	84/84	120/120	153/153	176/176	198/208	183/185	121/151	181/181	260/260
18356	94/94	120/120	123/141	162/174	192/196	179/185	121/121	185/189	257/263
18359	76/78	120/120	153/155	168/178	194/200	181/189	121/123	181/185	267/277
18365	78/82	120/120	159/169	172/174	194/194	181/181	133/135	185/191	247/285
18377	80/98	120/120	123/167	164/174	190/196	177/183	121/133	187/187	251/285
18397	78/98	120/120	123/141	164/172	190/196	177/183	121/121	185/187	285/285
18406	94/94	118/118	149/149	168/168	172/172	157/157	115/115	185/185	247/247
18407	96/96	118/118	149/149	170/174	172/172	157/157	115/115	187/189	247/247
18408	96/96	118/118	149/149	170/170	172/172	157/157	115/115	185/185	247/247
18411	94/94	118/118	149/149	170/170	172/172	157/157	115/115	185/185	247/247
18412	90/98	118/118	149/149	170/170	172/172	157/157	115/115	185/185	247/247
18413	90/96	118/118	149/149	168/170	172/172	157/157	115/115	185/185	247/247
18414	96/96	118/118	149/149	168/170	172/172	157/157	115/115	189/189	247/247
18422	80/80	146/152	167/169	178/180	218/220	203/205	143/149	193/193	259/261
18423	98/98	126/126	123/123	164/164	192/192	177/177	125/133	187/187	257/263
18424	98/98	120/126	123/123	164/164	190/190	177/177	125/133	187/187	251/263
18425	80/80	142/142	167/167	178/178	224/224	211/211	139/149	209/211	249/263
18426	84/84	118/138	123/123	164/164	190/190	177/177	133/133	187/187	277/285
18428	98/98	136/136	123/123	164/164	190/190	177/177	119/119	187/187	257/275
18429	98/98	126/126	123/123	164/164	190/190	177/177	125/125	187/187	275/275
COT1	78/82	120/120	153/153	172/176	192/198	179/183	121/121	181/193	0
COT2	78/82	120/120	153/153	172/176	192/198	179/183	121/121	181/193	261/261
COT3	78/82	120/120	153/153	172/176	192/196	179/183	121/121	181/193	269/269
COT4	94/94	120/122	171/171	182/188	224/224	209/209	123/133	181/181	267/267
COT5	84/94	120/120	153/171	188/188	220/244	183/205	133/153	181/181	267/267
COT6	90/90	120/120	0	180/188	224/224	185/209	119/133	181/181	267/267
COT7	84/94	120/120	171/175	180/182	224/224	209/209	119/123	181/195	261/261
COT8	90/106	120/120	123/123	186/186	220/220	175/209	121/123	181/185	273/273