

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



Análisis de la diversidad genética de las poblaciones silvestres del “cedro de altura” *cedrela angustifolia*. Utilizando marcadores moleculares

Laos Ayala, Andrea Del Carmen

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Asesora: Dra. Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú  
2022



**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES  
SILVESTRES DEL “CEDRO DE ALTURA” *Cedrela angustifolia*.  
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

**ANDREA DEL CARMEN LAOS AYALA**

Tesis para optar el Título Profesional de Licenciada en Biología

Asesora: Dra. Lidia Cruz Neyra

Lima, Perú  
2022

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE LAS POBLACIONES  
SILVESTRES DEL “CEDRO DE ALTURA” *Cedrela angustifolia*.  
UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES**

**ANDREA DEL CARMEN LAOS AYALA**

**MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR Y ASESORA.**

**PRESIDENTE:** Blgo. JORGE HAU CAMORETTI  
**SECRETARIO:** Blgo. MAURO QUIÑONES AGUILAR  
**VOCAL:** Blga. FLOR DE MARÍA MADRID DE MEJÍA  
**ASESORA:** Dra. LIDIA CRUZ NEYRA.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a todos los que participaron y contribuyeron en esta fase de mi vida, especialmente a mi querida familia, sobre todo a mi padre quien siempre me motivo a seguir con mi desarrollo personal y profesional.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxirribonucleico “Desoxirribonucleid Acid”.
AFLP	Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados “Amplified Fragment Length Polymorphism”.
AMOVA	Análisis de Varianza Molecular “Analysis of molecular variance”.
AR	Riqueza Alélica.
BSA	Albúmina Sérica Bovina “Bovine Serum Albumin”.
CTAB	Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio “Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide”.
DAPC	Análisis Discriminante de componentes Principales “Discriminant Analysis of Principal Components”.
dNTPs	Desoxirribonucleotidos Trifosfato “Deoxynucleotide Triphosphates”.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético “Ethylenediaminetetraacetic Acid”.
EHW	Equilibrio Hardy- Weinberg.
Fis	Coefficiente de endogamia.
Fst	Índice de Fijación.
He	Heterocigosidad esperada.
Ho	Heterocigosidad observada.
INIA	Instituto Nacional de Innovación Agraria.
ITIS	Sistema Integrado de Información Taxonómica. “Integrated Taxonomic Information System”.
LOD	Límite de Detección “Limit of Detection”
MINAGRI	Ministerio de Agricultura y Riego.
m s.n.m	Metros Sobre Nivel del Mar.
mg	Miligramo.
mL	Mililitro.
mM	Milimolar.
ng	nanogramo.
nm	Nanómetro.

OD	Densidad Óptica “Optical density”.
pb	Pares de Bases.
PCA	Análisis de componentes Principales “Principal Component Analysis”.
PCoA	Análisis de coordenadas Principales “Principal Coordinates Analysis”.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa “polymerase chain reaction”.
PIC	Contenido de Información Polimórfica
p/v	Porcentaje peso por volumen.
PVP	Polivinilpirrolidona.
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción “Restriction Fragment Length Polymorphism”.
r.p.m.	Revoluciones por minuto.
SSR	Secuencias Simples Repetidas “Simple Sequence Repeats”.
STR	Short Tandem Repeats “Repeticiones cortas en Tándem”.
SNP	Polimorfismos de nucleótido Simple “Single Nucleotide Polymorphism”.
TBE	Tris-Borato- EDTA.
U	Unidades.
UPGMA	Agrupamiento Apareado no ponderado utilizando media Aritmetica “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”.
μL	Microlitro.
μM	Micro Molar.
UV	Ultravioleta.
V	Voltios.
v/v	Porcentaje volumen por volumen.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	12
ÍNDICE DE FIGURAS.....	12
RESUMEN .....	14
ABSTRACT.....	15
I. INTRODUCCIÓN.....	16
1.1. Planteamiento del Problema.....	17
1.2. Justificación de la Investigación.....	18
1.3. Objetivos .....	19
1.3.1. Objetivo general.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.3.2. Objetivos específicos .....	19
II. MARCO TEÓRICO.....	20
2.1. Descripción general del Cedro: .....	20
2.1.1. Clasificación taxonómica. ....	20
2.1.2. Distribución geográfica .....	21
2.1.3. Características botánicas y morfológicas.....	22
2.1.4. Compuestos bioquímicos.....	23
2.1.5. Estado actual.....	24
2.2. Diversidad y variación genética. ....	24
2.2.1. Número de alelos (A) .....	25
2.2.2. Número efectivo de alelos (Ae) .....	25
2.2.3. Proporción de loci polimórficos.....	26
2.2.4. Heterocigosidad .....	26
2.2.5. Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW).....	27
2.3. Análisis de la estructura genética: .....	27
2.3.1 Estadísticos F.....	27
2.3.2 Análisis Molecular de Varianza – AMOVA .....	29
2.3.3 Structure:.....	29
2.3.4 Análisis Discriminante de Componentes Principales - DAPC .....	30
2.3.5 Análisis de coordenadas principales – PCOA.....	30
2.4. Evaluación del flujo genético .....	30
2.4.1 Tamaño efectivo de la población – Ne.....	31
2.5 Marcadores moleculares. ....	31
2.5.1 Microsatélites. ....	32
2.5.2 Ventajas y Limitaciones de los microsatélites.....	33



2.5.3	Aplicaciones de los microsatélites. ....	34
III.	ANTECEDENTES .....	35
IV.	HIPÓTESIS.....	40
V.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
5.1	Lugar de ejecución. ....	41
5.2	Tipo y Diseño de la investigación.....	41
5.3	Diseño de la investigación. ....	41
5.4	Variables.....	41
5.5	Operacionalización de las variables.....	42
5.6	Muestreo.....	43
5.7	Procedimiento .....	45
5.7.1	Extracción de ADN.....	45
5.7.2	Calidad del ADN.....	45
5.7.3	Cuantificación del ADN genómico .....	45
5.7.4	Selección de Marcadores microsatélites y amplificación por PCR.....	46
5.7.5	Electroforesis Capilar .....	47
5.7.6	Genotipado de los productos amplificados.....	47
5.8	Análisis de datos .....	48
5.8.1	Análisis de diversidad genética .....	48
5.8.2	Análisis de la estructura genética: .....	49
5.9	Aspectos éticos.....	49
VI.	RESULTADOS .....	50
6.1.	Extracción de ADN a partir de hojas .....	50
6.2	Amplificación de las regiones microsatélites .....	50
6.3	Índice de diversidad genética .....	51
6.3.1	Número de alelos .....	52
6.3.2	Frecuencia alélica .....	55
6.3.3	Contenido de Información Polimórfica (PIC) .....	64
6.3.4	Heterocigosidad .....	65
6.3.5	Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW) .....	68
6.4	Análisis de la Estructura Poblacional.....	70
6.4.1	Índice de Fijación.....	70
6.4.2	AMOVA .....	71
6.4.3	Structure .....	72
6.4.4	Análisis de Coordenadas Principales - PCOA.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
VII	DISCUSIÓN .....	74
VIII	CONCLUSIÓN.....	79

IX RECOMENDACIONES .....	80
X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
XI ANEXOS .....	87

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla N°1</b> Número de alelos por población.....	54
<b>Tabla N°2</b> Frecuencia de alelos raros.....	63
<b>Tabla N°3</b> Estimación de la Heterocigosidad, calculada por locus. ....	65
<b>Tabla N°4</b> Estimación de la Heterocigosidad, calculada para las 6 poblaciones, utilizando 8 locus. ....	67
<b>Tabla N°5</b> Equilibrio de Hardy- Weinberg evaluado por locus.....	69
<b>Tabla N°6</b> Equilibrio de Hardy- Weinberg evaluado por poblaciones .....	69
<b>Tabla N°7</b> Índice de Fijación por población .....	70
<b>Tabla N°8</b> Índice de Fijación por locus .....	70
<b>Tabla N°9</b> AMOVA.....	71

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Calidad del ADN extraído .....	50
<b>Figura 2</b> Electroferogramas generados por el software GeneMapper Versión 4.0. Se muestran los perfiles de los marcadores amplificados, CED2; CED18-CED65 .....	53
<b>Figura 3</b> Frecuencias alélicas del locus CED2 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	55
<b>Figura 4</b> Frecuencias alélicas del locus CED18 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	56
<b>Figura 5</b> Frecuencias alélicas del locus CED65 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	57
<b>Figura 6</b> Frecuencias alélicas del locus CED41 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	58
<b>Figura 7</b> Frecuencias alélicas del locus CED131 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	59
<b>Figura 8</b> Frecuencias alélicas del locus CED54 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	60
<b>Figura 9</b> Frecuencias alélicas del locus CF66A A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	61
<b>Figura 10</b> Frecuencias alélicas del locus CF66A A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.....	62
<b>Figura 11</b> Contenido de Información Polimórfica en los 8 locus .....	64
<b>Figura 12</b> Resultados del programa Structure: (A) Método de Pritchard, (B) Método de Evanno y (C) Método de Puchemaille. ....	72
<b>Figura 13</b> Grafico de barras del programa Structure, según la asignación de clúster genéticos para la especie de Cedro en las 6 provincias Andinas. ....	73

## **ÍNDICE DE ANEXO**

**Anexo 1.** Datos de colecta de muestras de Cedro en la Región Apurímac y Cusco.

**Anexo 2.** Preparación de soluciones utilizadas en la extracción de ADN.

**Anexo 3.** Protocolos.

**Anexo 4.** Lista de 13 cebadores (sentido y antisentido) que se utilizó para determinar la diversidad genética en *Cedrela angustifolia*.

**Anexo 5.** Protocolo de amplificación para los cebadores seleccionados

**Anexo 6.** Condiciones programado en el termociclador para la amplificación.

**Anexo 7.** Condiciones de corrida electroforética capilar utilizando el analizador genético ABI 3130xl.

## RESUMEN

Las especies del género *Cedrela* poseen un alto valor comercial debido a que su madera es considerada como una de las mejores maderas del mundo, es por esta razón que durante muchos años ha soportado una intensa actividad extractiva, lo que ha ocasionado un decrecimiento poblacional, que podría ocasionar pérdida de la diversidad genética. Por tal motivo, es necesario investigar la diversidad genética, elucidar la estructura de las poblaciones de cedro en nuestro país. En el presente trabajo se estimó la diversidad genética de 61 muestras de la especie *Cedrela angustifolia* de las regiones de Cusco y Apurímac, mediante la genotipificación con 13 marcadores microsatélites mediante un sistema de PCR multiplex y electroforesis capilar.

Los resultados mostraron que 8 de los 13 marcadores fueron polimórficos, se detectaron 32 alelos en total con un promedio de 4 alelos por locus, mientras que el promedio de la heterocigosidad esperada total fue de 0.51, lo que indica que la diversidad genética y polimorfismo genético fueron moderados. Además, el otro indicador de la diversidad genética, PIC, determinó que los locus CED18, CED131 y CF66A son altamente informativos, mientras que los CED2, CED65, CED41 y CED54 son medianamente informativos. El equilibrio de Hardy- Weinberg (EHW) demostró que el 37.5% de los loci evaluados se encontraban en desequilibrio (CED131, CED54 y CF66A), debido a que las poblaciones de *Cedrela* se encuentran drásticamente disminuidas por las actividades antropomórficas, puede estar ocasionando que no se cumplan los supuestos del EHW. El resultado del análisis de la estructura poblacional determinó alta diferenciación genética ( $F_{st} = 0.164$ ) evidenciando que la heterocigosidad poblacional se encuentra disminuida, lo que hace necesario un programa de manejo de la especie.

Palabras claves: *Cedrela angustifolia*, diversidad genética, electroforesis capilar, microsatélites.

## ABSTRACT

The species of the genus *Cedrela* have a high commercial value because their wood is considered one of the best woods in the world, it is for this reason that for many years cedar has supported an intense extractive activity, which has caused a population decrease, which it could cause loss of genetic diversity. For this reason, it is necessary to investigate genetic diversity and elucidate the structure of cedar populations in our country. In the present work, the genetic diversity of 61 samples of the *Cedrela angustifolia* species from Cusco and Apurímac regions was estimated by genotyping with 13 microsatellite markers using a multiplex PCR system and capillary electrophoresis. The results showed that 8 of the 13 markers were polymorphic, 32 alleles were detected with an average of 4 alleles per locus, while the average total expected heterozygosity was 0.51, indicating that genetic diversity and genetic polymorphism were moderate. Furthermore, the other indicator of genetic diversity, PIC, determined that the locus CED18, CED131 and CF66A are highly informative, while the CED2, CED65, CED41 and CED54 are moderately informative. The Hardy-Weinberg equilibrium (EHW) showed that 37.5% of the evaluated loci were in disequilibrium (CED131, CED54 and CF66A), due to the fact that the *Cedrela* populations are drastically diminished by anthropomorphic activities, it may be causing that the EHW assumptions are not met. The result of the analysis of the population structure determined high genetic differentiation ( $F_{st} = 0.164$ ) showing that population heterozygosity is decreased, which makes a species management program necessary.

Keywords: Capillary electrophoresis, *Cedrela angustifolia*, genetic diversity, microsatellites.

## I. INTRODUCCIÓN

El cedro es una especie arbórea que ha sido clasificada taxonómicamente como angiosperma, pertenece a la familia Meliaceae y género *Cedrela*. Esta familia se encuentra en los continentes de América, África y Asia con alrededor de 50 géneros y más de 1000 especies. En los neotrópicos se han identificado 8 géneros, siendo los géneros *Cedrela* y *Swietenia* los más importantes por su valor comercial.

Los representantes del género *Cedrela* se encuentran distribuidos desde el norte de México hasta el norte de Argentina, los únicos países sin presencia de especies de *Cedrela* son Uruguay y Chile.

Los incas denominaron al cedro andino como “siwis” o “sibis” y antiguamente el valle de Cusco estaba formado por grandes bosques de cedro. Debido a su importancia maderera las especies de este género son utilizadas desde hace varios años. En la época colonial y del virreinato la madera del cedro adquirió gran importancia y se utilizó en obras de arte como altares, marcos de pintura, retablos, entre otros.

En el año 2007, la exportación de cedro llegó a su punto más álgido, con la comercialización de 54,150 metros cúbicos; siendo los mayores compradores Estados Unidos y México, según el Anuario de Estadísticas ambientales 2016 del INEI. No obstante, debido a un mal uso de este recurso, por una intensa actividad extractiva, por la modificación del uso del suelo, estas especies evidenciaron en las últimas décadas un decrecimiento poblacional, lo que podría llevar a una pérdida de la diversidad genética. Tal es así que varias especies del género *Cedrela* se encuentran catalogadas como vulnerables, amenazadas y en peligro de extinción.

El Perú posee varias especies del género *Cedrela*, pero éstas no cuentan con un detallado estudio poblacional que indique el nivel de explotación que puede soportar.

Frente a este escenario se crea la necesidad de conocer el estado de la diversidad en que se encuentra la especie *Cedrela angustifolia*. Para ello, la biotecnología a través del empleo de

marcadores moleculares, nos permitirá conocer la amplitud y distribución de la variabilidad genética del cedro.

Por lo tanto, en el presente trabajo se pretende identificar la variación genética intraespecífica del cedro en la región andina utilizando marcadores moleculares microsatélites (SSR - Simple Sequences Repeats, por sus siglas en inglés), lo que proporcionará información relevante sobre el estado actual del cedro, que podría ser utilizada para contribuir en la conservación de la especie *in situ* o *ex situ*.

### **1.1. Planteamiento del Problema**

La región Cusco presenta 18 especies forestales, muchas de ellas nativas y categorizadas como amenazadas (Cardoso y Cuellar, 2016). Una de estas especies es *Cedrela angustifolia* que tiene gran importancia económica, social, cultural y ambiental. Debido a que la madera del cedro es considerada como una de las mejores maderas del mundo, presenta un alto valor maderero (Grau, *et al.*, 2006).

En el aspecto social la madera del cedro es utilizada por algunos pobladores para la construcción de su vivienda y suministro de combustible para cocinar (Santamaría, 2015), utilizada desde la época colonial y del virreinato en la construcción de marcos de pintura, obras de arte como altares, retablos, efigies, entre otros.

Por otro lado, la presencia de bosques de cedro aportaría un gran beneficio ambiental, capturando los gases del efecto invernadero (CO<sub>2</sub>), protegiendo el suelo y regulando la temperatura ambiental (Santamaría, 2015).

A causa de la tala indiscriminada por la sobreexplotación del recurso maderero y el uso del suelo para la ganadería, agricultura o minería, la especie *Cedrela angustifolia* forma parte de la lista de la Convención Internacional para el Comercio de Especies Amenazadas – CITES.



En este sentido, es imprescindible conocer el estado de la diversidad genética en la cual se encuentra el cedro y aportar sobre su vulnerabilidad.

## **1.2. Justificación de la Investigación**

Muchas de las especies del género *Cedrela* están catalogadas por la IUCN (International Union for Conservation of Nature) como vulnerables y en peligro de extinción, y de igual forma *Cedrela angustifolia* está incluida en la lista de CITES como especie amenazada; debido a la sobreexplotación y el cambio de uso del suelo para la agricultura y ganadería, provocando una reducción alarmante en las poblaciones (Lombardi, 2014).

Por lo tanto, conocer el estado de diversidad genética que presenta las poblaciones de *Cedrela angustifolia* en la región de Cusco es de suma importancia debido a que si tiene mayor diversidad genética mayor será la probabilidad de sobrevivir a cambios de su entorno. Una menor diversidad genética, el tamaño de la población se reduce, aumenta la homocigocidad; ocurriría una pérdida en el flujo genético, mayores niveles de endogamia, deriva génica, lo que conllevaría a la extinción de la especie.

Es imprescindible conocer el acervo genético del cedro, para lo cual se utilizarán marcadores moleculares tipo microsatélites, ya que conocer la estructura genética poblacional permite evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies frente a cambios ambientales (naturales o causados por el ser humano), además permite plantear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones.

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. Objetivo general**

Analizar la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *Cedrela angustifolia* en la región andina utilizando marcadores moleculares tipo microsatélites (SSR).

#### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Estandarizar el método de extracción de ADN de alta calidad para *Cedrela angustifolia* a partir de hojas.
- Estandarizar el protocolo para amplificar las SSR para la caracterización molecular.
- Evaluar la transferibilidad de 13 marcadores microsatélites en *C. angustifolia*.
- Analizar la estructura poblacional según los alelos amplificados de cedro de altura.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Descripción general del Cedro:

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica.

Las especies de cedro son conocidas por diferentes nombres comunes, los cuales generalmente van acompañados de algún adjetivo que hace referencia a alguna característica que presenta, es así que se le conoce como, cedro bayo, cedro coya, cedro de altura, cedro de Tucumán, cedro del cerro, cedro peludo, atoc cedro, cedro salteño, cedro virgen (Grau, *et al.*, 2006). Se le conoce como cedro por el parecido con el verdadero cedro del género de coníferas *Cedrus* (Pinaceae).

Las especies del género *Cedrela* han sido clasificadas por diversos investigadores, los cuales tienen algunas contradicciones al momento de clasificarlas, haciendo que varíe el número de especies en el género *Cedrela*.

Albert y López (2002), mencionan que, en 1951 Lawrence reconoce 100 especies, mientras que Smith en 1960 reconoce sólo 7; Pennington y Styles, en 1975, proponen 5 especies. Posteriormente según la cita de Lombardi (2014) menciona que Styles y M.T Germán vuelven a revisar el género, y en 1981 reconocen 7 especies: *Cedrela fissilis*; *C. lilloi*; *C. montana*; *C. oaxacensis*; *C. odorata*; *C. salvadorensis* y *C. tonduzii*, y nombran a 4 especies como imperfectamente conocidas las cuales son: *C. angustifolia*; *C. discolor*; *C. imparipinnata* y *C. weberbaueri*.

El cedro andino o *C. angustifolia* ha sufrido una constante revisión nomenclatural, el origen del nombre se apoya en dos elementos (Reyes, 2018):

- 1) Pintura no publicada de Sessé & Mocino, en la colección Torner del Instituto Hunt para la Documentación Botánica.
- 2) Espécimen del herbario G-DC (Conservatorio y Jardín Botánico de la Villa de Génova) identificado por Lagasca en 1807 como *C. odorata*.

En 1981 Style revisó el espécimen del herbario y lo clasificó como el holotipo de *C. angustifolia*, Reyes (2018), menciona que Mc. Vaughn estuvo de acuerdo con ello, pero el espécimen debería ser considerado como lectotipo, y también indicó que la especie debería ser citada como *C. angustifolia* DC., debido a que el nombre era atribuido a De Candolle.

En el 2010 Pennington y Muellner revisaron el espécimen del Herbario G-DC (Conservatorio y Jardín botánico de Villa de Génova) y pudieron confirmar la identidad del espécimen como *C. angustifolia*, la cual presenta todas las características de la especie conocida como *C. lilloi* C. DC. Cabe resaltar que el nombre de *C. angustifolia* fue acuñado mucho antes que *C. lilloi*.

El Sistema de Información Taxonómico Integrado (ITIS, 2011), clasifica a las especies del género *Cedrela* de la siguiente forma:

Reino	:	Plantae
Infrareino	:	Streptophyta.
Superdivisión	:	Embryophyta.
División	:	Tracheophyta.
Subdivisión	:	Spermatophytina.
Clase	:	Magnoliopsida.
Orden	:	Sapindales
Familia	:	Meliaceae.
Género	:	<i>Cedrela</i> .
Especie	:	<i>Cedrela angustifolia</i>

### **2.1.2 Distribución geográfica**

Las especies del género *Cedrela* se distribuyen desde México hasta Argentina con excepción de Uruguay y Chile (Grau, *et al.*, 2006; Lombardi, 2014). En Perú *Cedrela*

*angustifolia* ha sido registrada a una altitud de 500- 3500 msnm, en las regiones de Ancash (Yungay), Apurímac (Abancay, Aymares), Cajamarca (Contumazá, San Ignacio), Cuzco (Calca, Urubamba) y Lima (Lima). (Ministerio del Ambiente, 2012). Según Reyes (2018), el hábitat de *C. angustifolia* son los bosques montanos húmedos o yunga peruana, donde adquirió sus muestras de *C. angustifolia* en el distrito de Huanipaca departamento de Apurímac.

### **2.1.3 Características botánicas y morfológicas.**

Morfológicamente el género *Cedrela* es un árbol deciduo, la copa de los ejemplares jóvenes es angosta y en los adultos se vuelve ancha, presenta hojas compuestas, paripinnadas, los foliolos son opuestos o subopuestos con 7 a 13 pares; los foliolos son oval-lanceolados en *C. balansae* y *C. angustifolia* y generalmente elípticos en *C. saltensis*. Las flores son pequeñas de 7 a 8,5mm de longitud, son pentámeras, unisexuales, aunque con vestigios bien desarrollados del sexo opuesto y se encuentran en inflorescencia con varios cientos de flores. El fruto es una cápsula seca de forma ovoide a obovoide, dehiscente, septicida, que se abre desde la parte apical hacia la base. El epicarpio de la cápsula puede ser de color castaño claro a pardo oscuro según las especies, un fruto de *Cedrela* puede dar de 40 a 50 semillas las cuales tienen un ala terminal que les ayuda a ser dispersadas por el viento (Styles 1981; Albert y López, 2002; Grau, *et al.*, 2006; Lombardi, 2014). Niembro en 1995, analizó 150 frutos de cedro y tuvo como resultado que el 25 +/- 4 son semillas desarrolladas, de las cuales el 15 +/- 9 son capaces de dar origen a una nueva planta. Estas semillas segregan sobre el sustrato una sustancia química que impide el crecimiento de organismos invasivos como los hongos y evita la competencia con otras semillas (Marques *et al.*, 1996). Un ejemplar adulto puede llegar alcanzar hasta los 60 metros de altura, aunque usualmente se le encuentra de 30 - 40 metros (Smith, 1960).

La madera tiene como característica que es blanda, facilitando su manipulación al momento de trabajarla, pero también tiene como característica que es resistente haciendo que los trabajos en esta madera perduren durante muchos años, otra de las características de la madera es que una vez cortada es tolerante al ataque de insectos, por estas razones se le considera una de las mejores maderas del mundo (Grau, *et al.*, 2006).

El árbol de *Cedrela angustifolia* se distingue de sus similares ya que las hojas compuestas paripinnadas son glabras, el acumen es alargado y curvado (Reyes C., 2018). Los folíolos son lanceolados, la base es aguda, los folíolos tienen un ancho aproximado de 2 a 3.5cm, las flores presentan un cáliz profundo y regular, los márgenes de los pétalos libres en la antesis, los frutos son en capsula tienen una longitud de 2.5 a 4cm, (Penington y Mueller., 2010).

#### **2.1.4 Compuestos bioquímicos.**

La familia Meliaceae presenta en sus células secretoras compuestos triterpénicos las cuales tiene una acción relevante contra la herbivoría (Grau, *et al.*, 2006). En *C. odorata* identificaron que los compuestos terpénicos estaban asociados al rechazo del follaje como alimento en los coleópteros curculiónidos (Veitch *et al.*, 1999). Sin embargo, se han descrito dos especies de *Hypsipyla* (*Hypsipyla grandella* y *H. robusta*) en especie como *Cedrela odorata* cuyas larvas atacan plántulas de 0.5m hasta plantas de 3m de altura. (Becker, 1973; Grau, *et al.*, 2006).

Además de ejercer actividad biológica contra algunos insectos, hay estudios que aislaron gedunina en *C. odorata*, que es un limonoide de naturaleza terpenica que tiene acción biológica contra microorganismos como el *Plasmodium falciparum* agente causante del paludismo (Omar *et al.*, 2003).

### **2.1.5 Estado actual.**

Las poblaciones de muchas de las especies del género *Cedrela* se encuentra drásticamente disminuidas debido a las actividades antropomórficas, es por esta razón que han sido clasificadas por la IUCN (International Union for Conservation of Nature) e incluidas en CITES (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). Según la IUCN considera a *Cedrela angustifolia* (antes llamada *Cedrela lilloi*), y *C. fissilis*, en peligro de extinción; mientras que *C. odorata* está categorizada como vulnerable. En el 2006, según el Decreto Supremo 043-2006-AG se realizó una categorización de especies amenazadas de flora y fauna del Perú, en el cual categorizan en peligro a *Cedrela angustifolia* (antes llamada *C. lilloi*) y como vulnerable a *Cedrela fissilis* V.; *C. montana*, y *C. odorata*. A partir del 2001 CITES considera a *Cedrela odorata* dentro del apéndice III y en el 2012 también se considera a *Cedrela angustifolia* dentro del apéndice III. En este Apéndice se incluyen especies que están protegidas al menos en un país, el cual ha solicitado la asistencia de otras Partes en la CITES para controlar su comercio (Ministerio del Ambiente, 2012).

### **2.2. Diversidad y variación genética.**

La diversidad genética se puede definir como la variedad de alelos y genotipos presentes en una población, una especie o un grupo de especies (Frankham *et al.*, 2002). Asimismo, puede definirse a la variación genética como diferencias en los individuos que pertenecen a una población, estas diferencias en las frecuencias génicas o alélicas, permite que las poblaciones se adapten a los cambios de su entorno, evolucionen, permitiéndoles tener mayor probabilidad de sobrevivir, ya que poblaciones con poca diversidad genética son más vulnerables al asedio de nuevas enfermedades o plagas. (De la Torre, 2013). Los principales factores que merman la diversidad genética de las especies forestales son la deforestación y la fragmentación del hábitat

por el cambio del uso del suelo, generalmente como consecuencia de la expansión agrícola y áreas de pastoreo.

Los cambios en las frecuencias génicas, son causados por fuerzas que moldean la diversidad genética, estas fuerzas son las siguientes:

- Selección natural: sobreviven los más aptos.
- Selección sexual: Eligen a los que tienen mejor característica (mejores alelos).
- Mutaciones: Cambios que ocurre en la replicación del ADN.
- Deriva genética: Cambios que ocurre en la frecuencia genética, debido a cambios azarosos (ejm. Tornado, incendios etc.).
- Flujo de genes: Cuando nuevos individuos llegan y se aparean, cambia el pool genético.

La diversidad genética puede ser evaluada mediante los números de alelos, heterocigosidad observada y esperada, equilibrio de Hardy- Weinberg.

### **2.2.1 Número de alelos (A)**

Este parámetro también es llamado diversidad alélica o riqueza alélica, proporciona información de la diversidad de una población, mediante la identificación de alelos exclusivos o privados y compartidos entre las poblaciones (Via y Rada, 2015).

### **2.2.2 Número efectivo de alelos ( $A_e$ )**

Es una estimación de número de alelos igualmente frecuentes en una población ideal. Se calcula de la siguiente manera:

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}$$



Donde  $p_i$  es la frecuencia de cada alelo y los valores son sumados para todos los alelos y  $H_e$  es la heterocigosidad esperada en un locus.

### 2.2.3 Proporción de loci polimórficos

Un locus es considerado polimórfico en una población si presenta más de un alelo, teniendo el alelo común una frecuencia menor a 0.99 o 0.95. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$P = \frac{\text{número de loci polimórficos}}{\text{número de loci evaluados}}$$

### 2.2.4 Heterocigosidad

La heterocigosidad representa la porción de individuos heterocigotos en una población. A mayor heterocigosidad mayor diversidad genética.

La heterocigosidad la podemos estudiar como:

- **Heterocigosidad observada ( $H_o$ ):** Es la proporción de individuos heterocigotos observados entre el total de individuos evaluados en un locus determinado.

$$H_o = \frac{\text{Numero de heterocigoticos en el locus}}{\text{Numero total de individuos estudiados}}$$

- **Heterocigosidad esperada ( $H_e$ ).** Es la probabilidad de que en un locus único cualquier par de alelos escogidos al azar de la población sean diferentes entre sí. La  $H_e$  para un locus con dos alelos se calcula de la siguiente manera:

$$H_e = 1 - p^2 - q^2$$

Dónde:  $p$  y  $q$  corresponden a las frecuencias alélicas elevadas al cuadrado.

### 2.2.5 Equilibrio de Hardy Weinberg (EHW)

Se considera que una población está en equilibrio de EHW cuando la frecuencia alélica permanece constante de generación en generación, por lo tanto, la población no cambia ni evoluciona.

Para que una población esté en equilibrio:

- No debe haber selección natural.
- No hay selección sexual: El apareamiento es completamente al azar (panmixia).
- No debe haber mutaciones.
- Las poblaciones deben ser grandes.
- No ocurre deriva genética.
- No hay flujo genético.

### 2.3. Análisis de la estructura genética:

Mediante el análisis de la estructura genética poblacional se puede inferir la ancestría de los individuos estudiados con ayuda de la información genotípica. La estructura genética depende de las fuerzas evolutivas (selección natural, flujo génico, deriva génica, endogamia, mutación). Aquellos individuos que son genéticamente similares serán agrupados.

#### 2.3.1 Estadísticos F

Miden el nivel de diferenciación genética mediante las variaciones de las frecuencias alélicas y desviación del apareamiento al azar, en 1951 Wright planteó 3 parámetros (Índices de fijación) para poblaciones diploides ( $F_{is}$ ;  $F_{st}$  y  $F_{it}$ ).

- **F<sub>is</sub> – Coeficiente de endogamia:** Probabilidad de que dos alelos de un locus sean idénticos por proceder de un mismo alelo ancestral que se encuentra presente en ambos progenitores. Mide la reducción en la heterocigosidad individual debido a las desviaciones de los cruzamientos al azar, es decir el  $F_{is}$  refleja la endogamia debido a desviaciones de la panmixia. Los parámetros varían de -1 a 1, los valores negativos

indican exceso de heterocigotos, mientras que los valores positivos indican deficiencia de heterocigotos, el valor de cero representa que los individuos están en equilibrio.

$$F_{is} = \frac{H_s - H_I}{H_s}$$

$H_s$ :  $H_e$  en cada subpoblación;  $H_I$ : promedio de  $H_o$  en todas las poblaciones;  $S$ : número de genotipos

- **Fst – Coeficiente de coancestría:** Este estadístico señala la endogamia debido a la subdivisión de la población total en subpoblaciones. El rango varía de 0 a 1, donde los valores indican:
  - 0 → ausencia de diferenciación genética.
  - > 0 hasta 0.05 → poca diferenciación genética.
  - > 0.05 hasta 0.15 → moderada diferenciación genética.
  - > 0.15 hasta 0.25 → alta diferenciación genética.
  - > 0.25 muy alta diferenciación genética
  - 1 → la población no comparte genotipos en común.
- **Fit – Coeficiente general de consanguinidad:** mide la probabilidad de que dos alelos pertenecientes al mismo locus sean idénticos por descendencia respecto a la metapoblación (Acuña, 2016). Indica la endogamia de los individuos en la población total resultado de dos efectos previos: panmixia y estructura poblacional (Chumbe, 2020), sus valores varían de -1 a 1, donde -1 indica que todos los individuos son heterocigotos para dos alelos en la población total, mientras que 1 indica que todas las subpoblaciones son polimórficas y todos los individuos son polimórficos.

### **2.3.2 Análisis Molecular de Varianza – AMOVA**

El estadístico AMOVA estima la diversidad genética dentro y entre poblaciones (Acuña, 2016). Se basa en suma de cuadrados (SC), estas se calculan a partir de una matriz de distancias euclidianas entre todos los pares de individuos (Chumbe, 2020).

### **2.3.3 Structure:**

Es un programa basado en modelos de agrupamiento bayesiano, que ayuda a detectar la estructura genética, mediante clúster genéticos (K), basados en las frecuencias alélicas en cada locus para estimar los grupos. Este método sin conocer previamente los límites poblacionales y reduciendo al mínimo las desviaciones del Equilibrio H-W, asigna a los individuos (probabilísticamente) a K grupos (Acuña, 2016). El programa también utiliza la simulación en cadena de Markov Monte Carlo (MCMC), con la finalidad de obtener las iteraciones necesarias, para tener muestras aproximadas de una distribución de probabilidad cuando esta no puede ser simulada directamente (Acuña, 2016; Chumbe 2020). El burn-in, calentamiento o pre cocida es la primera etapa de las iteraciones, y esta no siempre suele brindar una respuesta definitiva debido a que a veces las diferencias en los cocientes de probabilidad son sutiles, es por eso que una alternativa es identificar el valor de K más probable. Según Chumbe, Besnier y Glover el 2013, introdujeron Parallel Structure que utiliza la computación multinúcleo por lo cual mejora el desempeño computacional. El mejor valor de K puede ser hallado mediante tres pruebas, 1) método de probabilidad de  $\ln Pr(X|K)$  de Pritchard et al. (2000), 2) método  $\Delta k$  de Evanno (Evanno et al. 2005) y la evaluación MedMeak, MaxMeak, MedMedk y MaxMedk de Puechmaille (2016).

### **2.3.4 Análisis Discriminante de Componentes Principales - DAPC**

Las distancias genéticas también pueden ser visualizadas mediante las gráficas del análisis multivariado no basados en modelos como el DAPC, las bajas estimaciones de distancia indican que las poblaciones se separaron desde un corto periodo de tiempo. Este análisis también requiere que el valor de K sea definido, el cual puede ser hallado mediante el método K-means, que utiliza un logaritmo de agrupamiento que se ejecuta secuencialmente con valores crecientes de K y se comparan usando el criterio de Información Bayesiano (BIC), siendo la solución óptima la que tiene BIC más bajo (Chumbe, 2020).

### **2.3.5 Análisis de coordenadas principales – PCOA**

Este es un método de ordinación, donde se calcula las distancias genéticas, ya que deriva en un gráfico donde se presenta los individuos de tal manera que las distancias geométricas entre individuos en el gráfico reflejan la distancia genética (Vía y Rada, 2015; Cárdenas, 2017). Este método utiliza una matriz de disimilitud o similitud.

## **2.4. Evaluación del flujo genético**

Los patrones de dispersión de una especie son evaluados mediante el flujo genético. Se puede evaluar los flujos genéticos históricos (>500 años) y los flujos genéticos recientes. Los flujos genéticos históricos se evalúan en contexto de exogamia mediante el  $F_{st}$ , sin embargo, basarse solo en el  $F_{st}$  es sesgado ya que se asume que la diferenciación genética se debe solo al flujo genético, sin tomar en cuenta la importancia histórica y el tamaño poblacional.

Por otro lado, hallar los flujos genéticos recientes, buscan individuos que tiene ascendencia migratoria en las dos generaciones anteriores.

#### **2.4.1 Tamaño efectivo de la población – Ne**

El Ne fue definido por Wright en 1931, como el tamaño de una población ideal que tiene las mismas propiedades de deriva genética que la población censada ( $N_c$ ), la población ideal debe cumplir las siguientes condiciones (Moreno, 2007):

- Debe haber panmixia
- El número de hembras debe ser igual al de machos
- Todos los individuos contribuyen genéticamente a la siguiente generación.
- La fecundidad por familia tiene una distribución de Poisson, es decir, que los individuos reproductivos únicamente se reemplazan en la población a la siguiente generación.
- La población está en equilibrio de Hardy-Weinberg.

#### **2.5 Marcadores moleculares.**

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que pueden ser físicamente localizados dentro del genoma de un organismo; éstas secuencias pueden ser o no ser codificantes (Rocha, 2003). Estos marcadores permiten detectar polimorfismos, en individuos, grupo de individuos, especies, o grupos taxonómicos superiores (Rocha, 2003). Los marcadores moleculares también pueden servir para realizar programas de mejoramiento genético ya que se podría detectar alelos de importancia económica.

Algunos de estos marcadores son el RFLP, AFLP los cuales utilizan enzimas de digestión que cortan el genoma en diferentes fragmentos, esta diferencia ocurre debido a las inserciones, deleciones o mutaciones del ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Rocha, 2003). Los marcadores RAPD es una técnica que utiliza varios cebadores universales de secuencia arbitraria, y de corta longitud, que se hibridan de forma aleatoria en todo el genoma, durante la reacción de PCR. (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Rocha 2003). Otro de los marcadores moleculares que utiliza la técnica del PCR son los SSR o microsatélites.

### 2.5.1 Microsatélites.

Los microsatélites o también llamados SSR (secuencias simples repetidas) son pequeñas regiones de ADN que se repiten varias veces dentro del genoma; estas regiones de ADN pueden ser de 1 a 6 pares de bases. (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Estas secuencias se encuentran dentro de los genomas de los eucariontes y procariontes, aunque con más frecuencia en el genoma de los eucariontes (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Zane *et al.*, 2002).

Los patrones más abundantes en plantas son (AT)<sub>n</sub>, (GA)<sub>n</sub>, (GAA)<sub>n</sub>, donde el número de repeticiones (n) puede ir de 10 a 100 patrones (Madesis *et al.*, 2013).

Los SSR se pueden clasificar según el tipo de unidad de repetición (mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, tetranucleótidos, pentanucleótidos, hexanucleótidos) o según su localización en el genoma, núcleo (nuSSR), mitocondria (mtSSR), cloroplasto (cpSSR).

Según Madesis (2013), las repeticiones de mononucleótidos A/T son más abundantes en las plantas, mientras que las repeticiones de trinucleótidos AGC/CGT; AGG/CCT y CCG/CGG son más frecuentes en las plantas monocotiledóneas a diferencia de las plantas dicotiledóneas que tienen repeticiones de tipo AAC/GTT; AAG/CTT y AAT/ATT. Las repeticiones de tetra, penta y hexanucleótidos no son frecuentes en los genomas de las plantas.

Otra de las clasificaciones es según el motivo repetido, y estas pueden ser perfecto simple, imperfecto simple, perfecto compuesto, imperfecto compuesto (Wang *et al.*, 2009).

El alto grado de polimorfismo que presentan las regiones de microsatélites es consecuencia de una alta tasa de mutación (desde  $10^{-6}$  hasta  $10^{-2}$  mutaciones por sitio por generación; Schlötterer, 2000). Esta alta tasa de mutación se les atribuye a dos mecanismos: El deslizamiento en el apareamiento de las hebras de ADN (Slippage misspairing) y el entrecruzamiento desigual (unequal crossing over) (Vázquez y Morales, 2014).

Para analizar un locus de un microsatélite se necesita diseñar cebadores específicos a las regiones flanqueantes de los microsatélites y luego amplificarlos mediante PCR. Se puede

amplificar más de un locus, siempre y cuando los locus sean de tamaños diferentes, y por lo tanto migraran de forma diferente en el gel de agarosa, este método se llama Multiplex, es decir cuando se utiliza más de un par de cebadores específicos en la preparación del master mix. (Vázquez y Morales, 2014).

### **2.5.2 Ventajas y Limitaciones de los microsatélites.**

Los SSR tienen las siguientes ventajas:

- Son codominantes, es decir que ambos alelos de un individuo heterocigoto pueden ser visualizados, lo que permite obtener más información de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).
- Se puede trabajar con un ADN que no está en excelente calidad, debido a que el microsatélite estudiado es más pequeño que la secuencia del loci, y estos pueden ser amplificados mediante PCR. Esta característica es muy importante ya que se puede utilizar en trabajos de forense.
- La distribución al azar de los microsatélites permite tener una cobertura amplia de cualquier genoma eucarionte. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Algunas de las limitaciones de los microsatélites es que han sido calificados como altamente homoplásicos debido a su alta tasa de mutación, la observación directa de secuencias de los microsatélites permite discernir algunos casos de homoplasia; sin embargo, el secuenciamiento no siempre revela la homoplasia. La posibilidad de encontrar una homoplasia aumenta cuando se estudia especies de diferente linaje con tiempos de divergencia profundos (Vázquez y Morales, 2014).



Los SSR no han sido aplicados en muchas especies silvestres debido a que no se encuentran caracterizadas, este proceso resulta costoso y muy laborioso, pero se llegaría a disminuir costo y tiempo si se tuviera la información del genoma. (Vázquez y Morales, 2014).

### **2.5.3 Aplicaciones de los microsatélites.**

El uso de los SSR también ha sido empleado en otros estudios como construcción de mapas genéticos, mapas físicos, estudio de ligamiento, genética poblacional como estructura genética de población, diversidad genética, para interpretar sistemas reproductivos, estimar el flujo de genes, niveles de endogamia, entre otros; por lo tanto, es muy eficiente para el análisis amplio y simultaneo de un genoma, De la Torre (2013).

### III. ANTECEDENTES

La familia Meliaceae y el género *Cedrela* fueron estudiadas y analizadas por diversas instituciones que buscaban ayudar a la conservación de estas especies.

Una de las primeras investigaciones realizada en la familia Meliaceae utilizando marcadores moleculares estuvo a cargo de White y Powell (1997), quienes utilizaron el marcador molecular SSR (microsatelite), pero debido al largo y costoso proceso de aislamiento de los microsatelites, utilizaron las secuencias de 11 cebadores identificados para *Swietenia humilis* en otras especies estrechamente relacionadas de la familia Meliaceae (*Cedrela odorata*; *Swietenia macrophylla*; *S. mahogoni*; *Khaya ivorensis*; *K. anthotheca*; *K. senegalis*; *Lovoa trichiloides*; *Entandrophragma angolense*; *Azadirachta indica*; *Melia azedarach*.). Sus resultados mostraron que los cebadores MAC59; MAC69 y MAC52 amplificaron en las 10 especies y adicionalmente los cebadores MAC45 y MAC63 también amplificaron para la especie *Cedrela odorata*. Según reportaron la amplificación exitosa de los loci de microsatélites les indicó que existe un alto nivel de conservación de secuencias dentro de las regiones, esto facilita su potencial uso en estudios de filogenia.

Posteriormente Gillies *et al.* (1997) estudiaron la variabilidad genética de 10 poblaciones de *Cedrela odorata* en Costa Rica, mediante la amplificación de 94 bandas polimórficas con 14 cebadores del marcador molecular RAPDs. Analizaron sus datos con el índice de diversidad Shannon's, el análisis de distancia genética por pares, el coeficiente de Jaccard, análisis neighbour- joining, y el análisis de varianza molecular (AMOVA). Utilizaron el índice de Shannon's para cuantificar los niveles de diversidad dentro y entre las poblaciones. Sus resultados mostraron una alta diferenciación entre las poblaciones originarias de las regiones del Pacífico Norte y Atlántico/ Pacífico Sur, con un 35.3% de la variación total lo cual lo

atribuyeron a las diferencias de las regiones, además encontraron poca diferenciación entre poblaciones de una misma región.

Algunos años después se realizó otro trabajo en Costa Rica a cargo de Cavers *et al.*, (2003), ellos analizaron los niveles y la distribución de la diversidad genética en diez poblaciones restantes, para lo cual utilizaron marcadores de cloroplasto y AFLP. Sus resultados mostraron que el nivel general de diversidad ( $H_t=0.27$ ) fue lo esperado para una especie arbórea de larga duración, sin embargo, otro de sus resultados mostro una profunda divergencia dentro de la especie, las poblaciones se diferenciaron en dos grupos los cuales tenían preferencia de hábitat húmedo y seco.

En el 2008 Hernández *et al.*, aislaron el ADN de un solo individuo de *Cedrela odorata*, a partir de las hojas secadas en silica gel y caracterizaron 9 cebadores [Ced2(GA)<sub>20</sub>; Ced18(GA)<sub>23</sub>; Ced41(TC)<sub>18</sub>; Ced44(TG)<sub>14</sub>(AG)<sub>17</sub>; Ced54(GA)<sub>15</sub>(AG)<sub>6</sub>G(GA)<sub>5</sub>; Ced61a(TG)<sub>10</sub>; Ced65(GA)<sub>7</sub>(CA)<sub>14</sub>; Ced95(CT)<sub>17</sub>(AC)<sub>13</sub>; Ced131(CT)<sub>16</sub>] para la amplificación de loci microsatélites, para lo cual construyeron una biblioteca de microsatelites enriquecida para di-(AG; GT; AT; GC) y trinucleotido (CAA; ATT; GCC) y el ADN enriquecido se clonó en el vector pGEM-T y se transformó en las células JM109, posteriormente secuenciaron un total de 200 clones, los niveles de polimorfismo lo detectaron utilizando muestras foliares de cedro y de familias de diferente procedencia y ampliamente separadas (Tulum, Xpujil y Hojancha), en todos los loci el numero vario de 14 a 30 alelos y los niveles de heterocigosidad observados variaron de 0.61 a 0.88. Encontraron algunas desviaciones del equilibrio Hardy-Weinberg que atribuyeron que probablemente se debía al efecto Wahlund.

En el territorio peruano existen pocos trabajos realizados en cedro a nivel molecular, uno de estos trabajos fue realizado por De la Torre en el año 2008 en la cual utilizó el marcador molecular AFLP y estudió la estructura poblacional y los niveles de variación genética entre y dentro de las poblaciones naturales de *Cedrela odorata* de dos zonas (Manú y los Amigos) ubicado en la región Madre de Dios. Utilizaron tres de las siete combinaciones AFLP debido a que presentaba mejor resolución y números de bandas [EcoRI-ACT/ MseI- CAT (103 loci polimórfico), EcoRI-AAC/MseI- CAC (97 loci polimórfico); EcoRI-ACC/MseI-CAT (58 loci polimórfico)] haciendo un total de 258 loci en 137 individuos de los cuales 255 (el 98.8%) fueron polimórficos.

El siguiente año Bertin Gandara (2009), analizó la estructura genética de 10 poblaciones de *Cedrela fissilis* en el centro sur de Brasil, con la finalidad de inferir estrategias para su conservación, Bertin desarrollo 9 locus microsatélites (CF9; CF26; CF32; CF34; CF63; CF66A; CF66B; CF78; CF83), los cuales identificaron 130 alelos en todas las poblaciones, sus resultados mostraron que la endogamia en las poblaciones fue relativamente baja.

Años después Soldati *et al.*, (2013) estudiaron ocho poblaciones remanentes de *C. balansae* en las selvas tropicales de las yungas argentinas, para lo cual utilizaron dos tipos de marcadores moleculares (SSR y AFLP), para estimar la variación genética, los procesos de endogamia, el flujo de genes y el impacto de la fragmentación en la diversidad genética. Por lo que seleccionaron 7 cebadores de microsatélite (Ced2; Ced41; Ced44; Ced61; Ced95; CF66; CF78) de 45 cebadores desarrollados para especies filogenéticamente cercanas y 382 AFLP polimórficos. Sus resultados mostraron niveles moderados de diversidad genética, y baja diferenciación genética entre poblaciones con ambos marcadores, en su trabajo identificaron 4

poblaciones prioritarias para la conservación, pero solo una población se encontraba en un área protegida.

En el 2014 Soldati *et al.* Volvieron a estudiar el género *Cedrela*, esta vez analizaron la transferibilidad de 51 cebadores de microsatélites diseñados para cuatro especies de la familia Meliaceae (*C. odorata*, *C. fissilis*, *Switenia humilis* y *S. macrophylla*) y se probaron en cuatro especies del género *Cedrela* (*C. fissilis*, *C. balansae*, *C. saltensis* y *C. angustifolia*), para lo cual realizaron 194 combinaciones SSR/especies de las cuales 122 amplificaron. Para *C. fissilis* amplificaron 23 de 41 marcadores dando 9 P (polimórficos), 7 M (monomórficos) y 7 NS (no específicos), para *C. balansae* amplificó 33 de 51 marcadores dando 13P; 9M; 11NS mientras que para *C. saltensis* amplifico 32 de 51 marcadores dando 13P, 9M, 11NS y para *C. angustifolia* amplificó 34 de 51 marcadores dando 7P, 17M, 10NS. Los cebadores que mostraron un patrón polimórfico para las 4 especies fueron el Ced2; Ced4a; Ced27 y Ced41.

En el mismo año Soldati *et al.*, (2014) publicó en la VI Reunión GEMFO su trabajo sobre diversidad genética de ocho poblaciones remantes de *C. fissilis* en la selva Paranaense (Noreste Argentino), para lo cual colectaron en total 107 individuos, y los analizaron mediante 10 SSR; 7 de ellos transferidos de *C. odorata*, 1 transferido de *S. macrophylla* y 2 desarrollados para *C. fissilis*, detectaron un total de 196 alelos, con un número de alelos promedio de 24,5 para las ocho poblaciones que estudiaron, adicionalmente encontraron 49 alelos exclusivos (Ae). Sus resultados mostraron que, a pesar del alto grado de deterioro de las poblaciones, la diversidad genética sigue siendo adecuada (diversidad intrapoblacional  $H_e$  promedio= 0.82), con el análisis mediante AMOVA evidenciaron una diferenciación genética moderada y mediante el análisis bayesiano les permitió identificar 4 grupos genéticos.

En el año 2015 Santamaría estudio la variabilidad genética de 163 individuos de *Cedrela montana* del valle Quijos y el Austro en Ecuador, mediante el marcador molecular codominante

SSR, para lo cual utilizaron 9 cebadores diseñados por Hernández *et al.*, (2008) para *C. odorata* (CED2; CED18; CED41; CED44; CED54; CED61A; CED65A; CED95; CED13), de los cuales solo logró utilizar 4 para el estudio de variabilidad genética de *C. montana* (CED41; CED65; CED54; CED131). Sus resultados muestran un alto nivel de diversidad debido a que obtuvo un alto valor en el parámetro de diversidad como heterocigosis ( $H_o=0.597$ ,  $H_e=0.584$ ) y en el Contenido de Información Polimórfica ( $PIC = 0.559$ ).

El siguiente año Tijerino *et al.*, (2016) evaluaron la diversidad genética de 5 poblaciones de *C. odorata* en Nicaragua, utilizaron el marcador molecular RAPD, recolectaron un total de 95 individuos. El dendrograma de neighbour- joining agruparon a las 5 poblaciones en dos grupos, según los valores de heterocigosis  $H_e$  y  $H_o$  una de las poblaciones tuvo un nivel de diversidad genética bajo, identificada como la población de Esquipulas ubicada en el Departamento de Matagalpa.

El mismo año Cardoso y Cuellar, mediante el Programa de Investigación Agraria Forestal del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), realizaron trabajos para la recuperación y revaloración de *C. angustifolia* en la estación Experimental Agraria Andenes en la región de Cusco, Perú. Para lo cual realizaron colecta de semillas y material botánico en las provincias de Anta, Quispicanchi, Calca y Urubamba, para su identificación morfológica y genética. Las semillas fueron plantadas en almácigos dentro de un invernadero, en total tuvieron 13740 plántones, y posteriormente los plantaron en el anexo de la estación experimental de Mollepata, después de evaluar su manejo silvicultura, empezaron a plantar en los lugares de procedencia, con la finalidad de incrementar su población.

#### **IV. HIPÓTESIS**

- El análisis genético utilizando marcadores moleculares tipo SSR en las poblaciones silvestres de *Cedrela angustifolia* de la región andina evidenciará su diversidad genética y sus niveles de endogamia.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Lugar de ejecución.

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Biología Molecular y Genómica (LBMyG) de la Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (DRGB), de la sede Central del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Lima, Perú.

### 5.2 Tipo y Diseño de la investigación.

La investigación es de tipo experimental.

### 5.3 Diseño de la investigación.

El diseño de la investigación es de tipo experimental, consistió en la extracción de ADN del tejido foliar de 61 muestras de *Cedrela angustifolia* procedente de la región andina de Cusco y Apurímac. Recolectadas por el Blgo. Fernando Serna, el Ing. Sergio Cardoso y la Bach. Andrea Laos, en noviembre del 2017. Se uniformizó la concentración del ADN extraído a 10ng/ul. Posteriormente se realizó el PCR con 13 cebadores para probar la transferibilidad de 9 cebadores diseñados para *Cedrela odorata* (Hernández *et al.*, 2008) y 8 cebadores diseñados para *C. fissilis* (Bertin, 2009); todos los cebadores presentan la cola M13 en el sentido 3´-5´. Posteriormente, se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa y en analizador genético. Con ayuda del programa GeneMapper se determinó los alelos y se realizó la matriz de alelos. Posteriormente se analizó los parámetros como riqueza alélica, el equilibrio de Hardy-Weinberg, utilizando los softwares GeneAlex, STRUCTURE, R Studio.

### 5.4 Variables.

#### Variables independientes:

- Fragmentos SSR amplificados de *Cedrela angustifolia*.

#### Variables dependientes:

- Riqueza alélica.
- Equilibrio de Hardy Weinberg.
- Distribución poblacional.



## 5.5 Operacionalización de las variables.

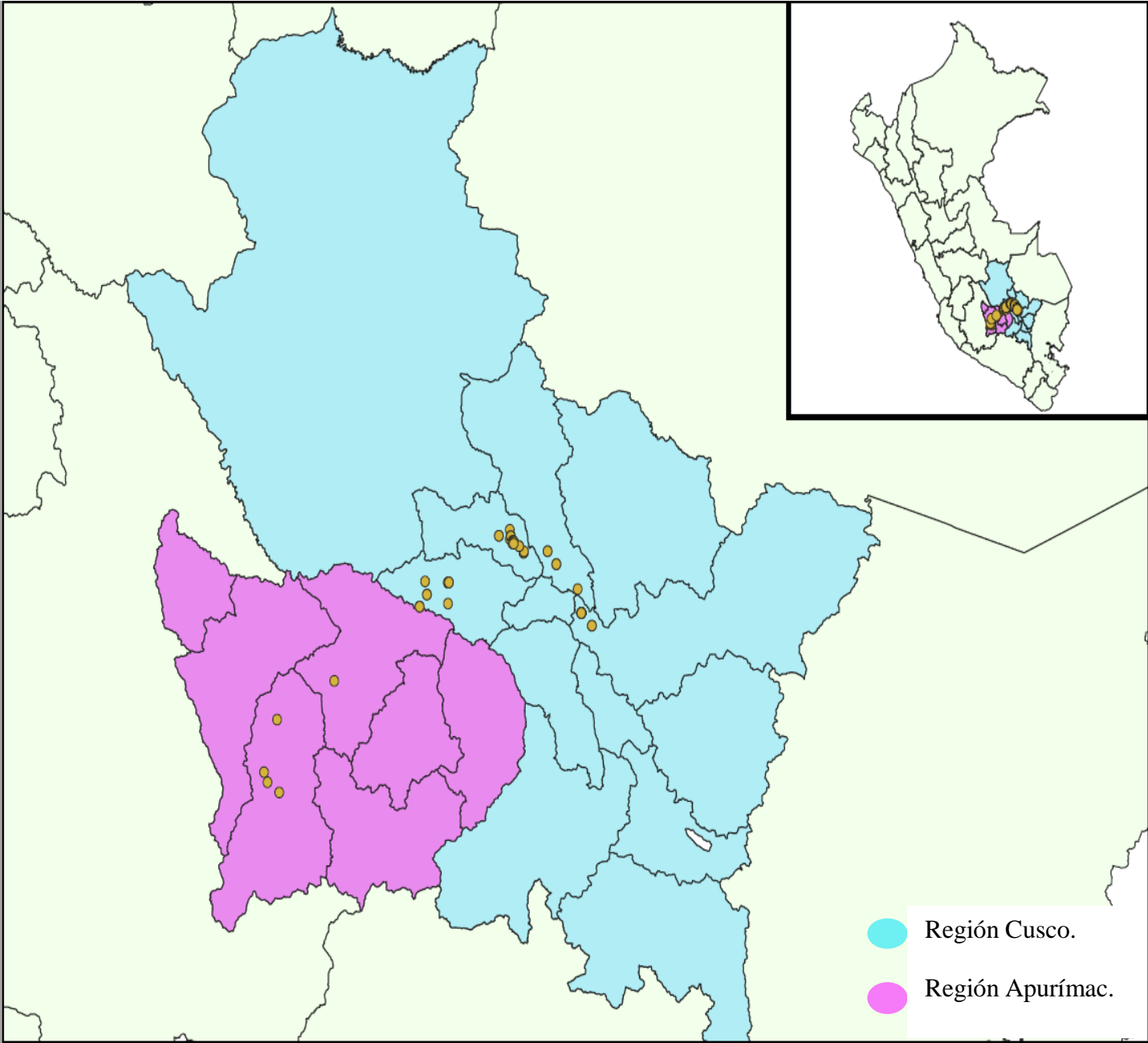
OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES					
Objetivos específicos	Variable	Indicador	Escala de medida	Instrumento	Categorización de la variable
Estandarizar un método de extracción de ADN de alta calidad a partir de hojas de Cedro.	Bandas nítidas no degradadas de ADN en gel de agarosa.  Pureza y valores de concentración óptimos.	Presencia o ausencia de bandas nítidas no degradadas.	Nominal	Cabina de electroforesis horizontal.  Espectrofotómetro	Cualitativa
Estandarizar un protocolo para amplificar las SSR para la caracterización molecular y evaluar la transferibilidad de 13 marcadores microsatélites en <i>C. angustifolia</i> .	Bandas nítidas no degradadas con diferentes pesos visualizados en geles de agarosa.	Presencia o ausencia de bandas nítidas no degradadas.	Numeral	Termociclador  Cabina de electroforesis horizontal	Cualitativa
Analizar la diversidad genética y la estructura poblacional según los alelos amplificados de Cedro de altura.	Análisis de diversidad genética (Riqueza alélica, Equilibrio H-W, He, Ho)  Análisis de distancia genéticas (dendrograma)	Coefficientes de EHW, He, Ho	Numeral	Software de Genética de Poblaciones.	Cuantitativa

## 5.6 Muestreo.

Se colectó hojas adultas de 61 individuos de *C. angustifolia*, en la Región andina de Cusco (provincias de Anta, Urubamba, Calca y Quispicanchi) y Apurímac (provincia Aymaraes y Abancay), en la colecta se tuvo en cuenta los siguientes criterios: 1) Cubrir la mayor área posible; la distancia mínima entre cada árbol fue de 80 a 100 metros, con la finalidad de minimizar la probabilidad de muestrear individuos relacionados (Gillies *et al.*, 1997). 2) Los individuos colectados presentaron un Diámetro Altura de Pecho (DAP) mayor a 10cm.

Durante la colecta, se utilizó una tijera telescópica para cortar las hojas, debido a que muchos individuos tenían una altura mayor a 20 metros. Posteriormente las hojas fueron envueltas en papel toalla para quitarles el exceso de humedad y posteriormente fueron almacenados en una bolsa de papel debidamente rotulado. Las muestras fueron trasladadas al Laboratorio de Biología Molecular y Genómica del INIA, donde se cambió el papel toalla y finalmente fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Mapa de las regiones Muestreadas.



## **5.7 Procedimiento**

### **5.7.1 Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó a partir de las hojas adultas (frescas), tomando como base el método de CTAB descrito por Sunil Kumar-Sahu *et al.*, (2012), a este método se realizó modificaciones en cuanto a las concentraciones del buffer de extracción, tiempo de incubación, entre otros.

### **5.7.2 Calidad del ADN**

La calidad del ADN se determinó mediante electroforesis, en gel de agarosa al 1% (p/v). El gel de agarosa fue sumergido en el buffer de corrida TBE 1% (v/v) y en cada pocillo del gel se cargó la mezcla de 3µl de muestra de ADN y 7µl del buffer de carga 1/1000 (el cual consistía en el agente intercalante de ADN GelRed y el SaltB10x (Azul de bromofenol, naranja g, xilen cianol, sucrosa, TBE10% (v/v)). Posteriormente las muestras fueron corridas a 100 V (voltios) durante 50 minutos. Finalmente, las bandas de los geles fueron visualizados mediante exposición con luz UV, para lo cual se utilizó el fotodocumentador ChemicDoc™ XRS de Biorad.

### **5.7.3 Cuantificación del ADN genómico**

Para determinar la pureza del ADN extraído, las muestras fueron cuantificadas utilizando un espectrofotometro Epoch Micro-Volume (Biotek), a una longitud de onda de DO<sub>260</sub> nm y DO<sub>280</sub> nm, los datos fueron observados en el programa GEN5™ y se consideró como ADN puro cuando la relación DO<sub>260</sub>/DO<sub>280</sub> era de 1.8 – 1.9.

#### **5.7.4 Selección de Marcadores microsatélites y amplificación por PCR**

Según la bibliografía revisada se seleccionó 13 cebadores (Anexo 4), desarrollados por Hernández, *et al.*, (2008) y Bertin (2009) de las especies de *C. odorata* y *C. fissilis* respectivamente, con la finalidad de estudiar la transferibilidad de los cebadores e identificar la riqueza alélica (número de alelos), heterocigosidad esperada y observada en las poblaciones de *C. angustifolia*.

A estos 13 cebadores se les agregó en la parte inicial del sentido 5'-3' (directo), la secuencia del cebador universal M13 (**CACGACGTTGTAAAACGAC**), lo cual permitió en la electroforesis capilar separar los fragmentos por fluoróforos, como 6-FAM (azul); VIC (verde); PET (rojo) y NED (amarillo).

Con estos cebadores se formó grupos para abarcar el genoma del cedro, según el rango de amplificación, la temperatura de fusión y los fluoróforos .

Las reacciones de amplificación (PCR) se ajustaron a un volumen final de 10µl y consistió en 10ng/ul de ADN genómico, 5x buffer kapa, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10uM dNTPs, 1uM de cada cebador (directo y reverso), 1uM del cebador universal M13 (unido a uno de los 4 fluoróforos), BSA (Albúmina sérica bovina) y 5U/ul de la enzima Taq kapa, las concentraciones finales de los reactivos dependerán si los grupos formados son simples o duplex .

Las amplificaciones se realizaron en el termociclador Mastercycler® pro de Eppendorf según las siguientes condiciones: denaturación inicial a 94°C por 2 minutos; seguida de 30 ciclos que consistió en denaturación a 94°C por 1 minuto, una temperatura de hibridación específica para un par de cebadores por 1 minuto y una extensión a 72°C durante 1 min; seguido de 10 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, 53°C (temperatura de hibridación del cebador universal) durante 30 segundos, y 72°C por 30 segundos; y un paso final de extensión a 72°C por 10 minutos, finalmente

la reacción se detiene a 4°C. Las amplificaciones posteriormente fueron corridas en gel de agarosa al 2% a 100V durante 40 minutos para visualizar los fragmentos amplificados.

### **5.7.5 Electroforesis Capilar**

Los productos de PCR fueron separados mediante electroforesis capilar, en el analizador genético ABI 3130xl de Applied Biosystems™, lo cual permitió separar los fragmentos de acuerdo a su tamaño (pb) y por fluoróforos.

Para realizar la electroforesis capilar, se colocó en cada pocillo de la placa de corrida, la siguiente mezcla: marcador de peso molecular LIZ600 (0.4µl), formamida desionizada (8.6µl) y el producto de PCR (1µl). Una vez realizada la mezcla, la placa fue incubada a 95°C durante 5 minutos, lo cual permite denaturar el ADN, e inmediatamente después la placa fue incubada a -20°C durante 5 minutos. Finalmente se colocó la placa en el equipo y se dio inicio a la corrida electroforética.

Durante la electroforesis capilar los fragmentos SSR fueron incididos con un láser lo que ocasionó que los fluoróforos adheridos emitan una fluorescencia, esta señal de fluorescencia fue convertida a un formato digital y con ayuda del programa GeneMapper versión 4.0 fue visualizados en forma de picos (electroferogramas) (Via y Rada, 2015).

### **5.7.6 Genotipado de los productos amplificados.**

Los alelos que son representados como picos en los electroferogramas son medidos en URF (Unidad de fluorescencia relativa) (Acuña, 2016).

Para hacer la discriminación de picos y ruido se cambió el límite de detección “Limit of detection” (LOD) a 100 URF para que los picos que fueron inferiores a estos valores automáticamente se descartaron (debido a que no eran considerados como alelos). Posteriormente se analizó todos los

electroferogramas para verificar si los alelos asignados por el software eran correctos, aquellos que no eran correctos se modificó manualmente. Una vez corregido los errores, la matriz de alelos fue exportada a Excel para los correspondientes análisis.

## **5.8 Análisis de datos**

### **5.8.1 Análisis de diversidad genética**

Se realizó una copia de la matriz de alelos en formato de texto en el programa **Notepad++**, para luego guardarlo en un archivo con extensión *.str*. Posteriormente se ingresó este archivo al programa **PGDSpider** v2.1.1.5, para finalmente tener un archivo en el formato Genepop y poder hacer los análisis en **Rstudio**.

Para la evaluación de la diversidad genética se calculó, el número de alelos observados por locus, alelos efectivos, riqueza alélica, heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) mediante el programa **Rstudio** versión 3.5.1 con los paquetes estadísticos Adegnet, Polysat, StrataG. Además, se halló si la diferencia entre  $H_e$  y  $H_o$  fue estadísticamente significativa, mediante el test de homogeneidad de varianza Barlett. El Contenido de Información Polimórfica fue evaluado con el programa **Power Maker**. Adicionalmente se corroboró todos los resultados con el programa **GenAlEx**.

El equilibrio Hardy Weinberg se evaluó en el programa en línea **GenePOP on the web** v4.7, mediante tres pruebas: 1) prueba de probabilidad, 2) prueba de excesos de heterocigotos y 3) prueba de déficit de heterocigotos. Los parámetros para las cadenas de Markov fueron 10000 dememorization (burnin), 1000 batchs y 10000 iteraciones por batch. El rango de confianza que se consideró inicialmente fue de  $P\text{-valor} > 0.05$ , realizando la prueba de Corrección de Bonferroni para 8 loci el rango de confianza vario a  $P\text{-valor} > 0.006$ .

### 5.8.2 Análisis de la estructura genética:

Para evaluar la estructura genética de los individuos, se calcularon mediante el programa **GenAlEx** los índices de Fijación propuesto por Wright en 1951 para poblaciones diploides,  $F_{st}$ ,  $F_{is}$ , y  $F_{it}$ .

Además, se realizó el AMOVA (Análisis Molecular de la varianza) mediante el programa **GenAlEx**, se hicieron 999 permutaciones. Adicionalmente mediante el servidor CIPRES (<https://www.phylo.org/>) denominado **parallelStructure**, se ejecutó el programa Bayesiano **Structure**, los parámetros evaluados fueron de K 1 al 10, con 10 iteraciones para cada valor de K, el valor de Burn-in fue de 200 000 y 1000 000 de MCMC.

Para comparar el valor del clúster genético (K) se realizó el DAPC (Análisis Discriminante de Componentes Principales), mediante el programa **RStudio** con el paquete estadístico **adegenet**, y adicionalmente se realizó el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) mediante en el programa **GenAlEx**, este es un método de ordenación, que deriva en un gráfico donde se presenta los individuos de tal manera que las distancias geométricas entre individuos en el grafico reflejan la distancias genéticas (Via y Rada, 2015; Cárdenas, 2017).

Finalmente se halló el Número efectivo de la población ( $N_e$ ), mediante el programa **NeEstimator**, el cual utiliza un método basado en el DL (Desequilibrio de Ligamiento).

### 5.9 Aspectos éticos.

Durante el desarrollo de la presente tesis, se evitó generar grandes cantidades de residuos, teniendo la cultura de reutilización; los desechos peligrosos tales como cloroformo; alcohol isoamílico entre otros fueron desechados correctamente, evitando así la contaminación ambiental y riesgo para la salud humana.

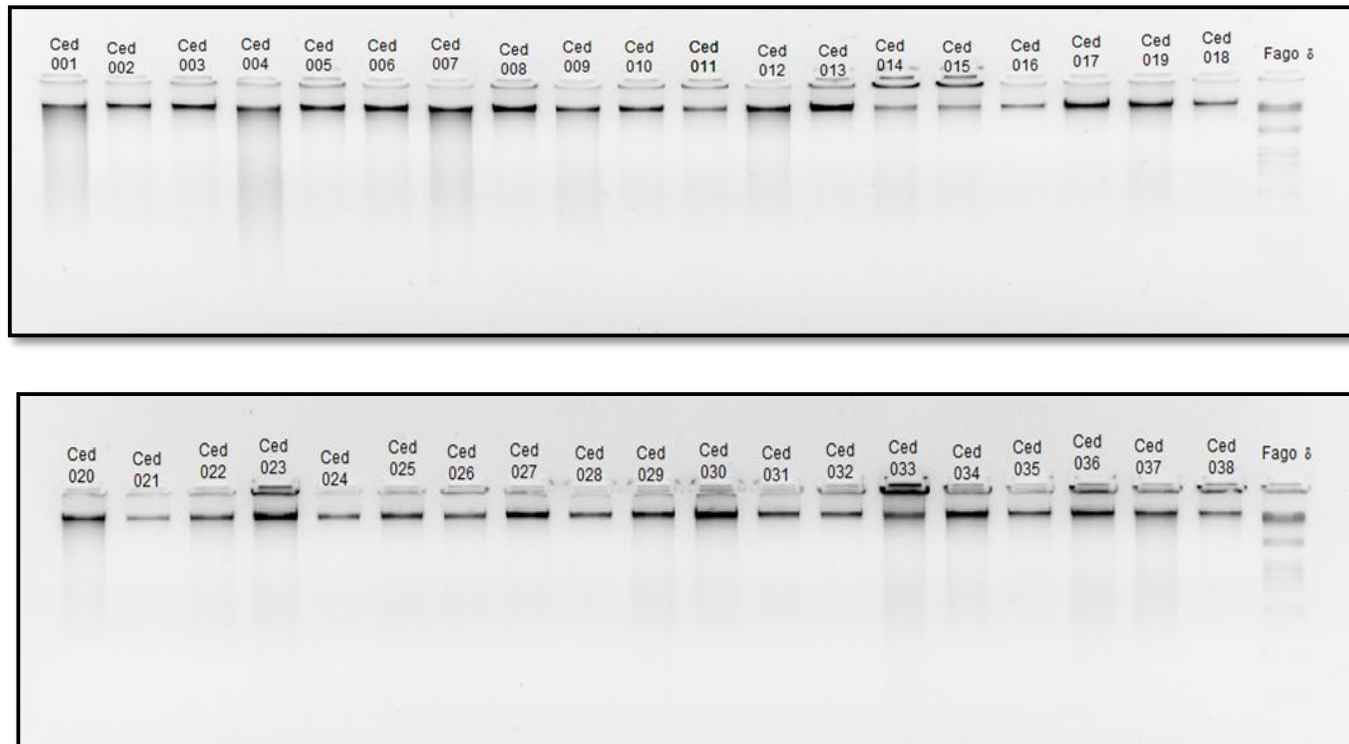


## VI. RESULTADOS

### 6.1. Extracción de ADN a partir de hojas

Se obtuvo ADN genómico a partir de las hojas de *C. angustifolia* siguiendo el protocolo modificado de Sunil Kumar-Sahu *et al.*, (2012), con un valor de 1.9 en la relación de A260/280 y con una concentración promedio de 554.3 ng/ul (Max= 2,482.7ng/ul, Min=26.8ng/ul).

La calidad también fue corroborada, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, donde se observó bandas de ADN sin degradación, comprobando su pureza.



**Figura 1 Calidad del ADN extraído**

Para observar la calidad de las muestras extraídas, estas fueron corridas en un gel de agarosa en buffer de corrida TBE al 1X. En cada pocillo se cargó la mezcla de 3ul de muestra y 7ul de buffer de carga (Gel Red- SaltB 1:1000). Las condiciones de corrida electroforética fueron 40V, durante 50 minutos.

## 6.2 Amplificación de las regiones microsatelites.

De los 13 cebadores seleccionados para la amplificación de regiones microsátélites fueron excluidos cinco (CED44; CED95; CED61A; CF83; CF34) debido a que no amplificaron.

Los cebadores fueron agrupados en 3 grupos, según el rango de amplificación, la temperatura de hibridación y los fluoróforos utilizados para cada marcador.

Como resultado de la amplificación de hojas de 61 ejemplares de *C. angustifolia*, se detectaron un total de 32 alelos de los 8 locus microsátélites. Cabe resaltar que el número máximo de alelos encontrados por genotipo de cada marcador fue de 2, este rango de alelos concuerda con la diploidía que presenta el cedro.

**Tabla 1** Grupos multiplex, rango de amplificación, temperatura de hibridación y fluoróforos utilizados para cada marcador.

	Primer	Rango (pb)*	T° de hibridación	fluoróforos
PRIMER GRUPO	CED2	130-170	55 °C	FAM
	CED44	180-240	55.5 °C	
	CED18	130-150	55 °C	VIC
	CED65	160-200	55.5 °C	
	CED41	120-160	55.5 °C	PET
	CED95	190-250	55 °C	
	CED61A	240-270	55.5 °C	NED
	CED131	80-120	55 °C	
SEGUNDO GRUPO	CED54	120-160	55 °C	FAM
	CF83	312-328	54 °C	PET
	CF66A	113-175	56 °C	NED
	CF34	128-168	56 °C	VIC
TERCER GRUPO	CF78	122-168	56 °C	VIC

\*Rango de amplificación desde el alelo de menor tamaño detectado hasta el de mayor tamaño, sin los 19 nucleótidos de la cola M13.

### 6.3 Índice de diversidad genética

#### 6.3.1 Número de alelos

Se logró identificar los alelos de los 8 locus microsatélites, estos fueron visualizados a través del programa GeneMapper en forma de electroferogramas (picos). Fig.2

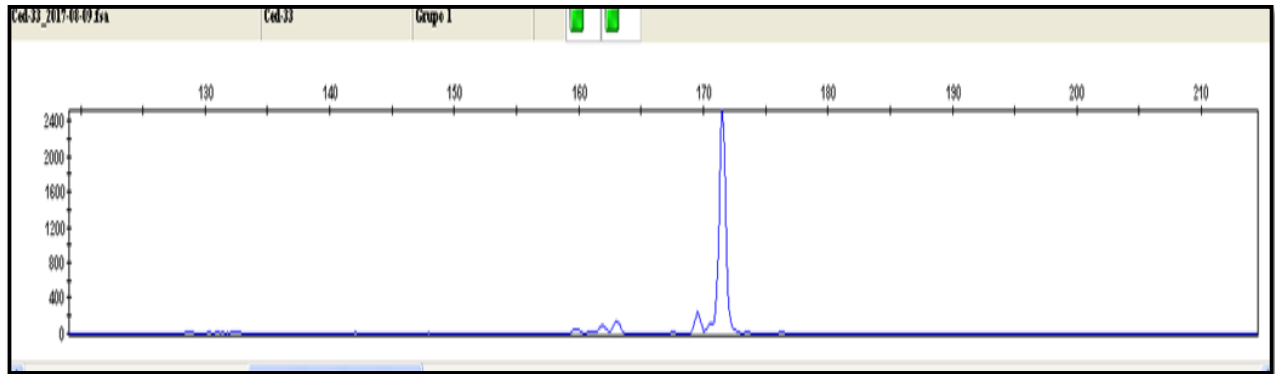
Como resultado de la amplificación de hojas de 61 ejemplares de *C. angustifolia*, se halló que el Número total de Alelos (A) fue de 32, con un promedio de 4 alelos por locus.

El locus que presentó mayor diversidad alélica fue CF66A con 7 alelos, mientras que los locus CF78 y CED41 presentaron menor diversidad alélica, cada uno con 2 alelos.

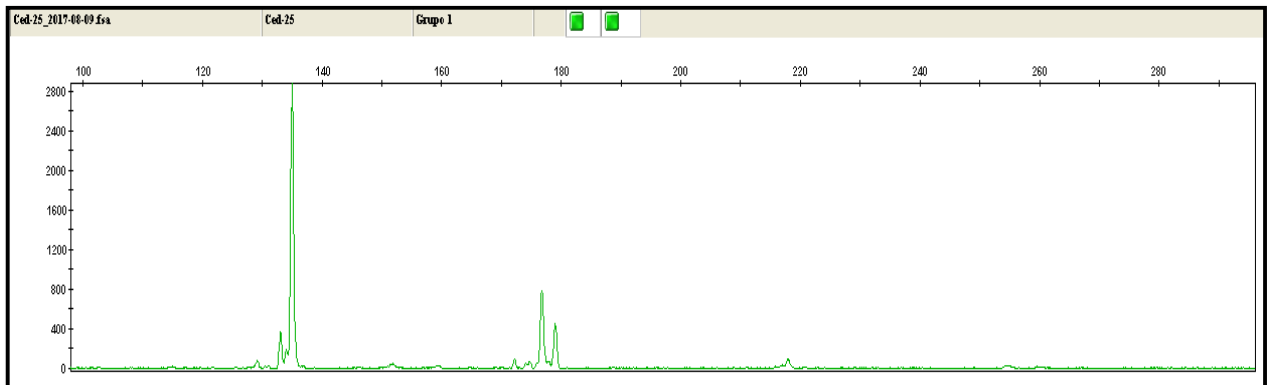
De las poblaciones analizadas, se determinó que la población proveniente de la provincia de Urubamba presenta mayor riqueza alélica, debido a que evidenció mayores números de alelos (30 alelos) en comparación con la población de la provincia de Abancay que presenta menor número de alelos (15 alelos), Tabla 2.

Cabe resaltar que la estimación de la diversidad genética basada en la riqueza alélica tiene como desventaja principal estar directamente relacionado con el tamaño de la muestra (Via y Rada, 2015).

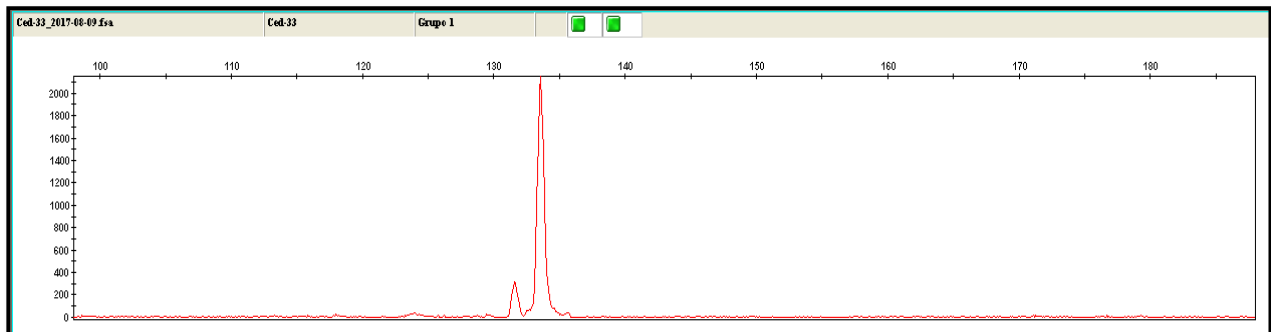
## Electroferogramas del marcador CED2



## Electroferogramas de los marcadores CED18-CED65



## Electroferogramas del marcador CED41



**Figura 2** Electroferogramas generados por el software GeneMapper Versión 4.0. Se muestran los perfiles de los marcadores amplificados, CED2; CED18-CED65

**Tabla N°2** Número de alelos por población

Locus	Población						Ae
	Abancay	Aymaraes	Anta	Urubamba	Calca	Quispicanchi	
<b>CED2</b>	2	2	4	5	5	3	5
<b>CED18</b>	1	3	3	3	3	3	3
<b>CED65</b>	2	2	3	3	3	2	3
<b>CED41</b>	2	2	2	2	2	2	2
<b>CED131</b>	3	2	4	4	3	4	4
<b>CED54</b>	2	3	3	4	4	4	4
<b>CF66A</b>	2	3	3	7	4	4	7
<b>CF78</b>	1	1	2	2	2	2	2
<b>Total</b>	15	18	24	30	26	24	32
<b>Promedio</b>	1.88	2.25	3	3.75	3.25	3	4

A= número de alelos, Ae= Número de alelos efectivos.

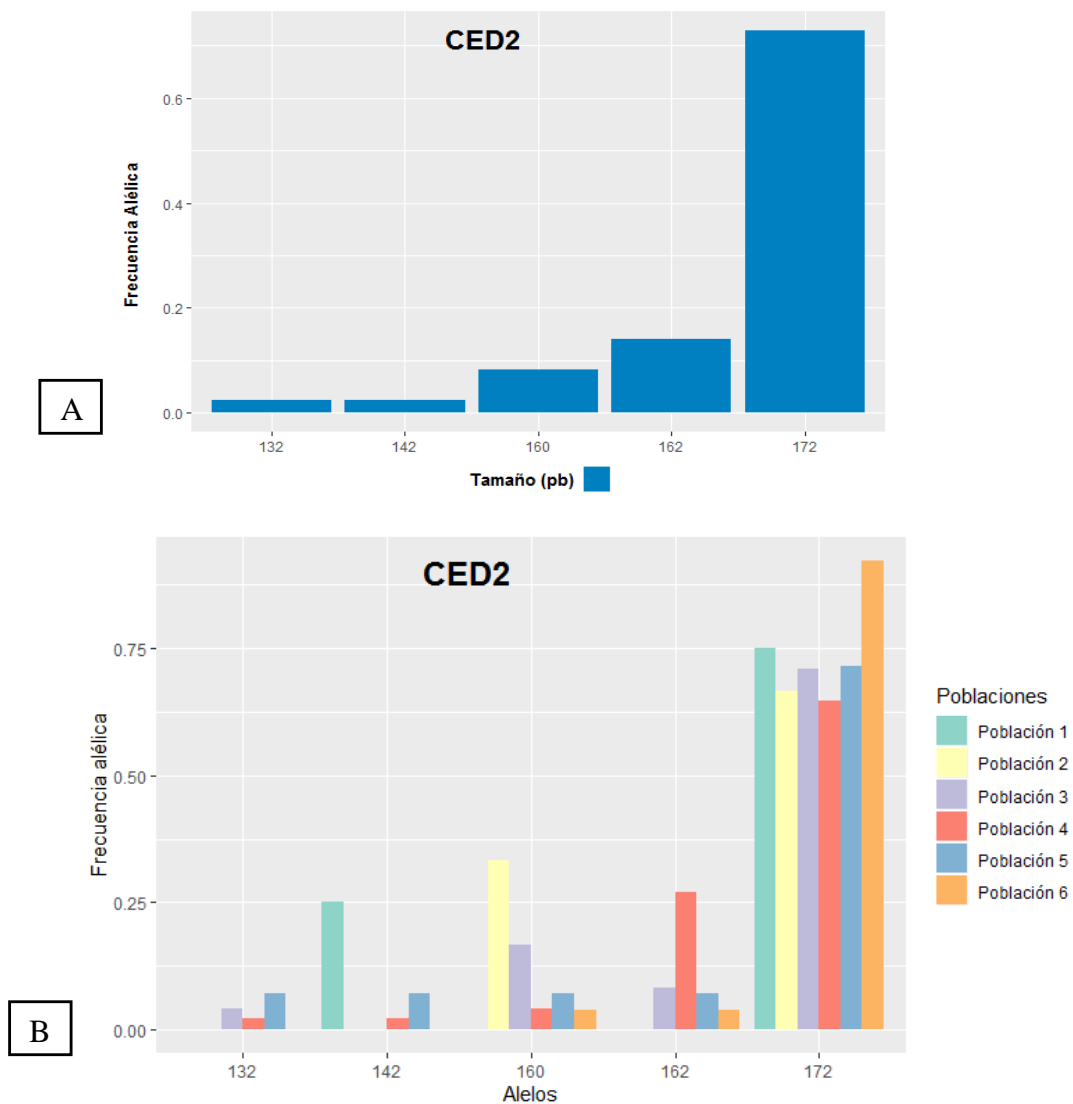
Población	N	A	Ae
<b>Abancay</b>	2	1.88	1.68
<b>Aymaraes</b>	3	2.25	1.88
<b>Anta</b>	12	3	2.15
<b>Urubamba</b>	24	3.75	2.11
<b>Calca</b>	7	3.25	2.15
<b>Quispicanchi</b>	13	3	1.69

N= número de muestras, A= número de alelos, Ae= Número de alelos efectivos.

### 6.3.2 Frecuencia alélica

#### a) CED2

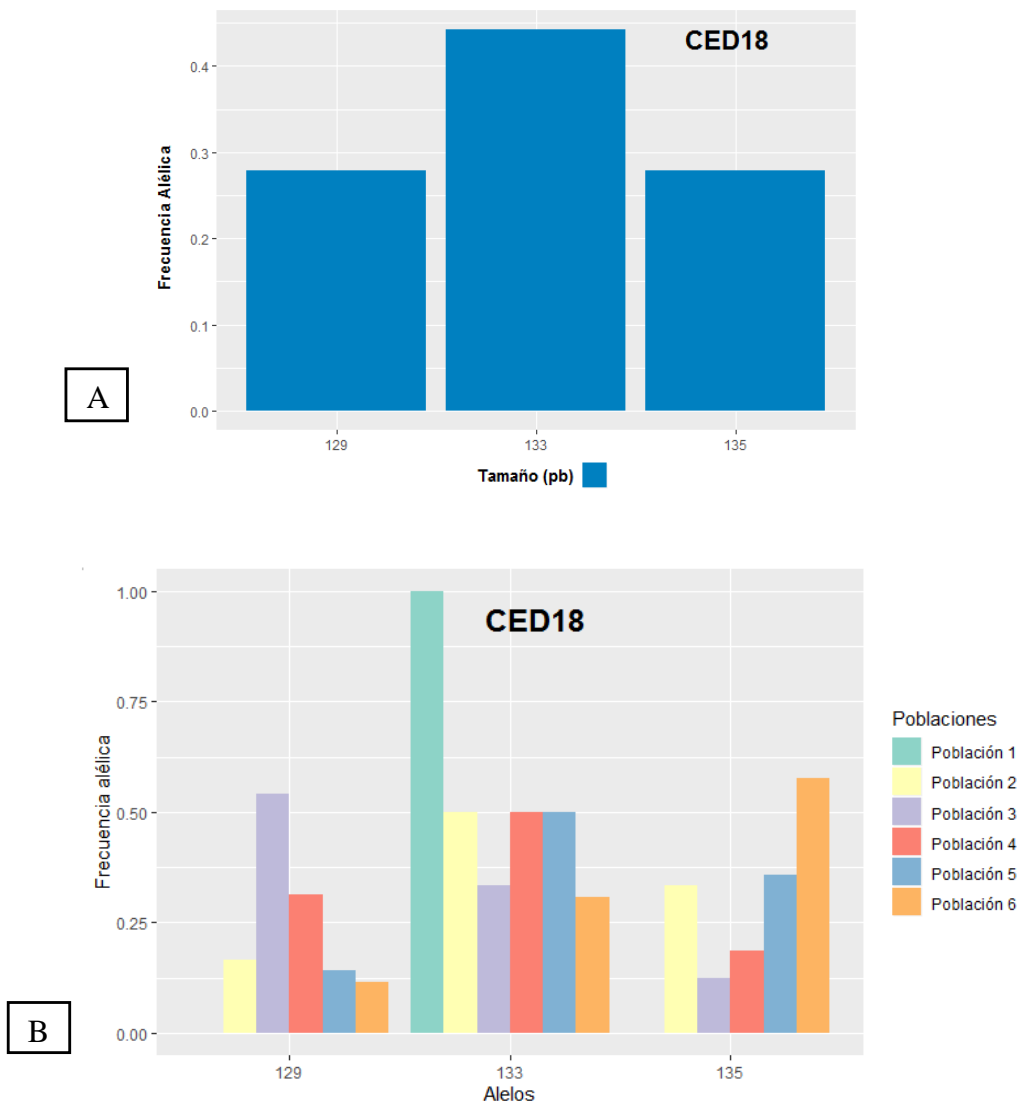
El alelo más común para el locus CED2 fue el de 172pb con una frecuencia alélica promedio de 0.730, mientras que los alelos de 132pb y 142pb tuvieron una menor frecuencia alélica, ambas de 0.025. Cabe resaltar que el alelo de 172pb amplificó en las 6 poblaciones muestreadas siendo la población de Quispicanchi (población 6) quien presentó una mayor frecuencia alélica (0.923) (**Fig.3**).



**Figura 3** Frecuencias alélicas del locus CED2 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población

## b) CED18

En el locus CED18 amplificaron 3 alelos (129pb, 133pb y 135pb), siendo el alelo de 133pb quien tiene una mayor frecuencia alélica promedio de 0.443, mientras que los dos alelos 129pb y 135pb presentan una frecuencia alélica de 0.279. Cabe mencionar que alelo de 133pb amplifíco en las 6 poblaciones, siendo la población de Abancay (población 1) quien presento mayor frecuencia alélica (1.0). (Fig.4)

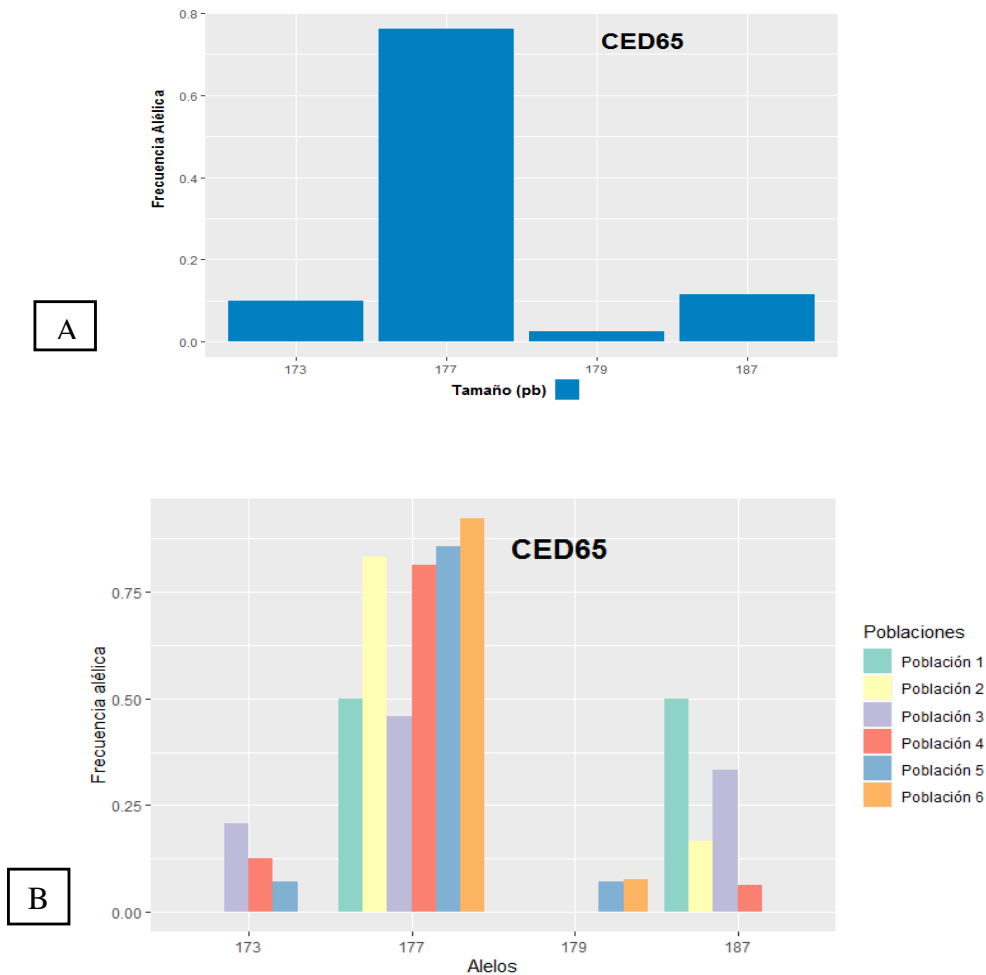


**Figura 4** Frecuencias alélicas del locus CED18 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

c) **CED65**

El locus CED65 presento 4 alelos (173pb, 177pb, 179pb, 187pb). El alelo que presenta una mayor frecuencia alélica promedio (0.762) es de 177pb, en cambio aquel que posee una menor frecuencia alélica (0.025) es el alelo de 179pb.

Adicionalmente cabe mencionar que el alelo de 177pb es el único que amplificó en las 6 poblaciones del cedro, siendo la población de Quispicanchi quien posee mayor frecuencia alélica (0.923). (**Fig.5**)



**Figura 5** Frecuencias alélicas del locus CED65 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

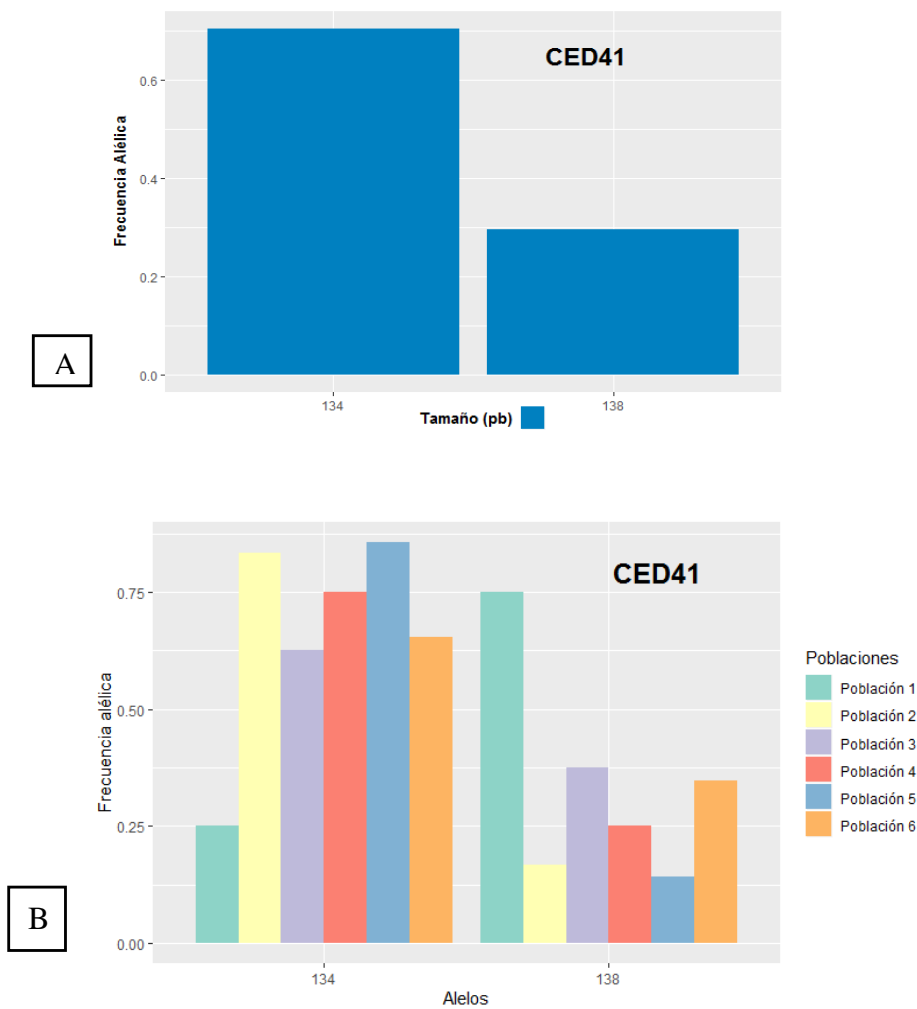


#### d) CED41

En el locus CED41 se observó solo 2 alelos amplificados en las poblaciones, de 134pb y 138pb con las frecuencias alélicas promedio de 0.705 y 0.295 respectivamente.

Ambos alelos amplificaron en las 6 poblaciones, siendo la población de Calca (población 5) quien muestra mayor frecuencia alélica (0.857) en el alelo de 134pb, mientras que la población de Abancay (población 1) presenta una mayor frecuencia alélica del alelo de 138pb (0.75)

(Fig.6)



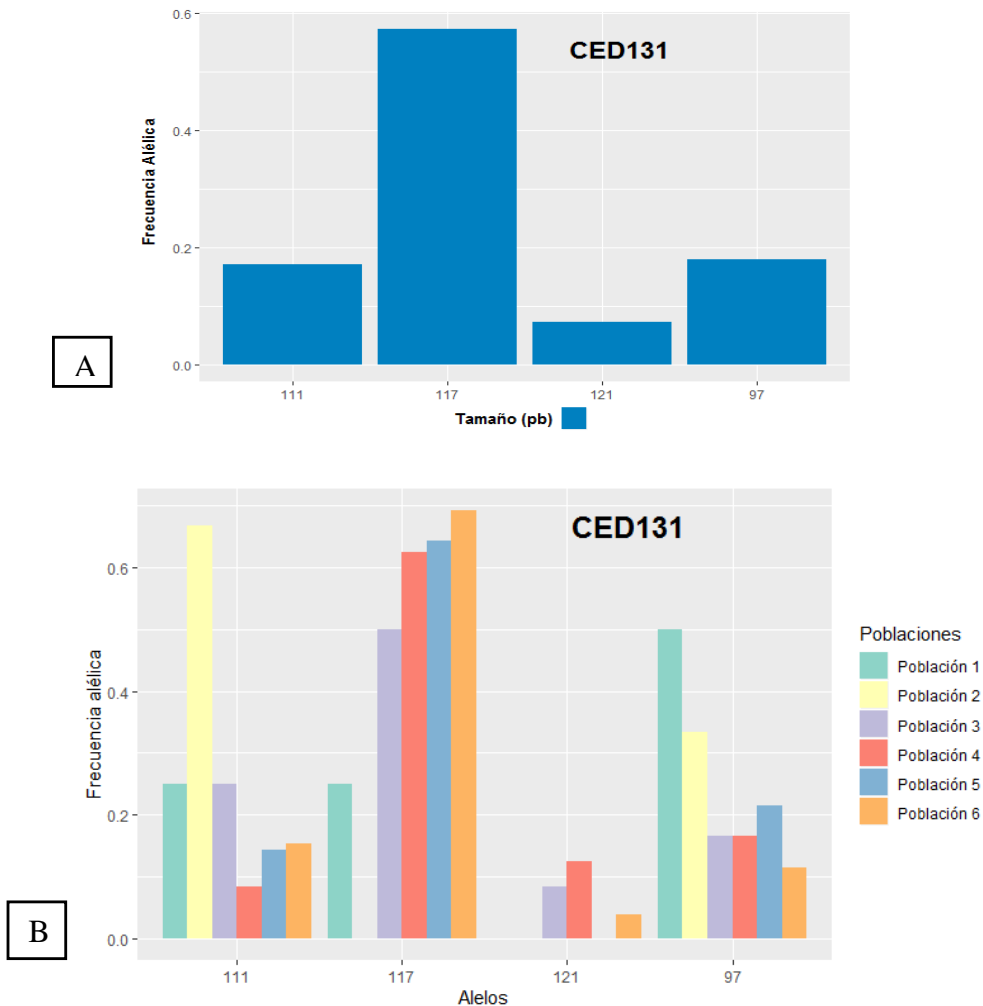
**Figura 6** Frecuencias alélicas del locus CED41 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

e) **CED131**

En el locus CED131 se observaron 4 alelos diferentes que amplificaron en la población, las cuales son de 97pb, 111pb, 117pb, 121pb.

El alelo con mayor frecuencia alélica fue el de 117pb (0.574), mientras aquel que presenta menor frecuencia alélica fue el de 121pb (0.074).

El alelo de 111pb amplificó en las 6 poblaciones de cedro, siendo la población de Aymaraes (población 2) con mayor frecuencia alélica (0.667). (**Fig.7**)



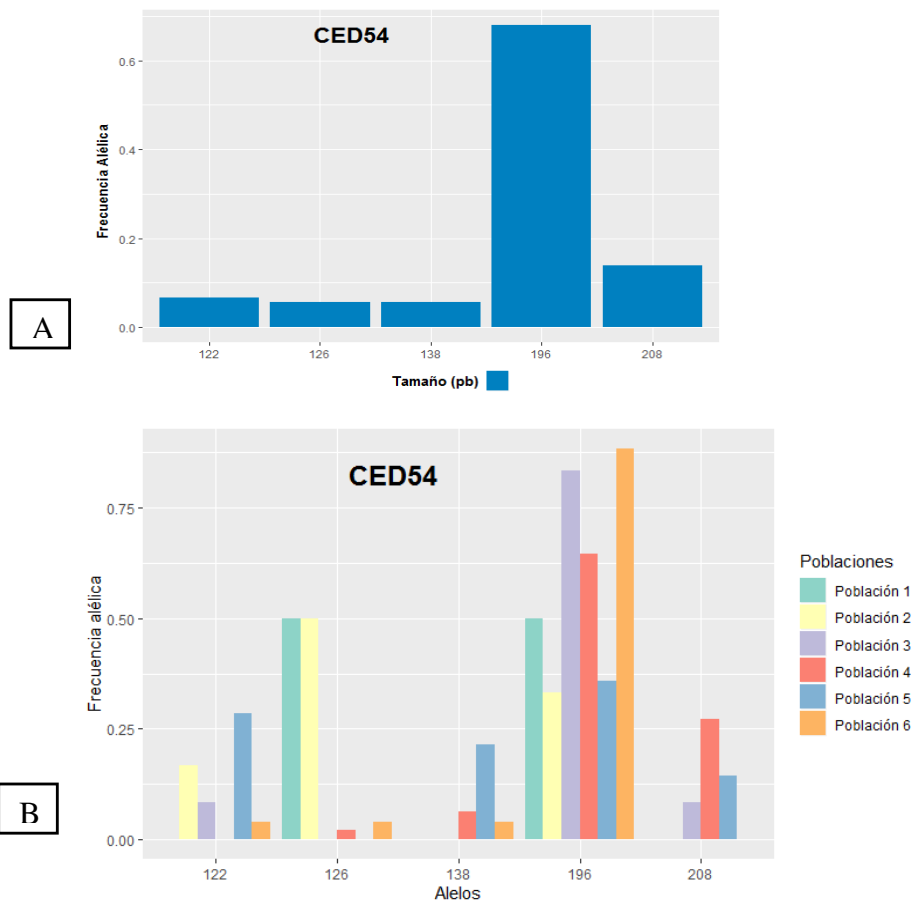
**Figura 7** Frecuencias alélicas del locus CED131 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

## f) CED54

En el locus CED54, se observó que amplificaron un total de 5 alelos, las cuales fueron de 122pb, 126pb, 138pb, 196pb, 208pb.

El alelo de 196pb es aquel que presenta una mayor frecuencia alélica (0.680), mientras que los alelos de 208pb, 122pb, 126pb y 138pb tienen las frecuencias alélicas de 0.139; 0.066; 0.057 y 0.057 respectivamente.

Además, cabe mencionar que el alelo de 196pb amplificó en todas las poblaciones de cedro, siendo la población de Quispicanchi (población 6) la que presenta mayor frecuencia alélica (0.884). (Fig.8).



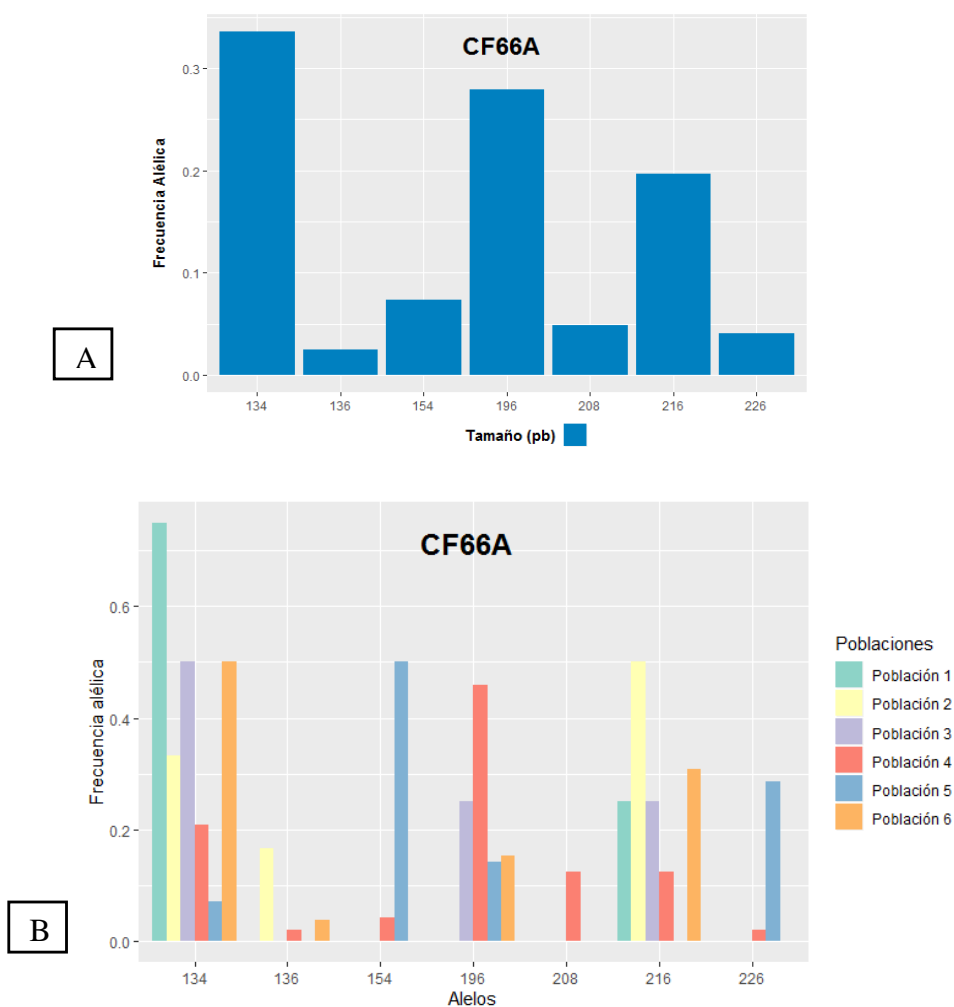
**Figura 8** Frecuencias alélicas del locus CED54 A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

### g) CF66A

El locus CF66A tuvo mayor número de alelos amplificados para las poblaciones de cedro, con un total de 7 alelos (134pb, 136pb, 154pb, 196pb, 208pb, 216pb y 226pb).

El alelo que presenta mayor frecuencia alélica es de 134pb (0.336), en cambio el alelo con menor frecuencia es de 136pb (0.025).

Cabe resaltar que único alelo que amplificó en las 6 poblaciones, es el alelo de 134pb, siendo la población de Abancay (población 1) quien posee mayor frecuencia alélica (0.75). (**Fig.9**)

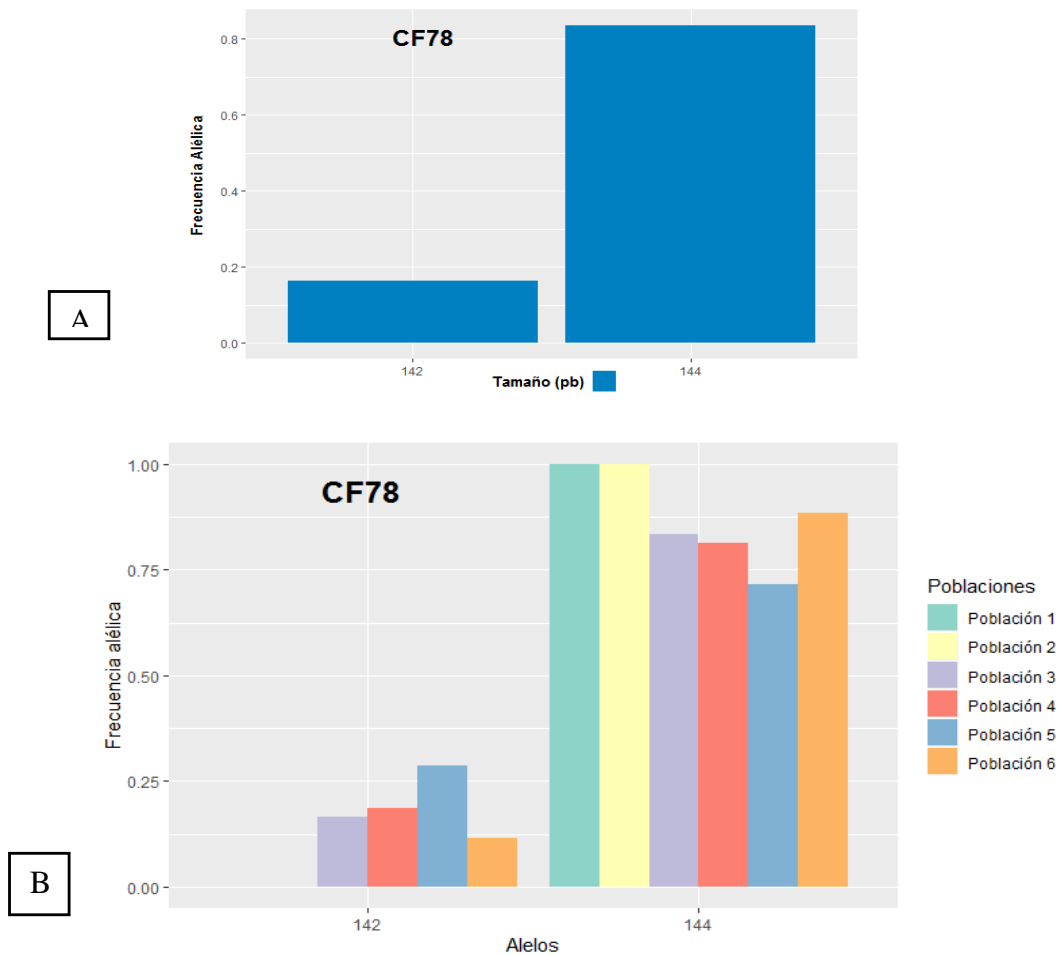


**Figura 9** Frecuencias alélicas del locus CF66A A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

## h) CF78

En el locus CF78, se amplificaron 2 alelos en las poblaciones de cedro, siendo estos de 142pb y 144pb. El alelo con mayor frecuencia alélica (0.836) tiene 144pb, mientras que el alelo de 142pb tiene una frecuencia de 0.164.

Además, es importante mencionar que el alelo que amplifico en todas las poblaciones fue el de 144pb, siendo las poblaciones de Abancay y Aymaraes (población 1 y 2) quienes presentan mayor frecuencia alélica (1.0). (Fig.10)



**Figura 10** Frecuencias alélicas del locus CF66A A) Distribución de frecuencias alélicas del locus. B) Distribución de frecuencias alélicas por población.

También se presentaron alelos raros (AR) cuya frecuencia alélica es menor a 0.05 (**Tabla 3**), pero no se observaron alelos muy raros (AmR) cuya frecuencia es menor a 0.01, debe tomarse en consideración que los AR y AmR dependen del tamaño poblacional, mientras más grande sea la población hay mayor probabilidad de detectarlos.

**Tabla 3** Frecuencia de alelos raros

Marcador	Alelos Raros (AR)	Frecuencia alélica
<b>CED2</b>	132	0.025
	142	0.025
<b>CED65</b>	179	0.025
<b>CF66A</b>	136	0.025
	208	0.049
	226	0.041

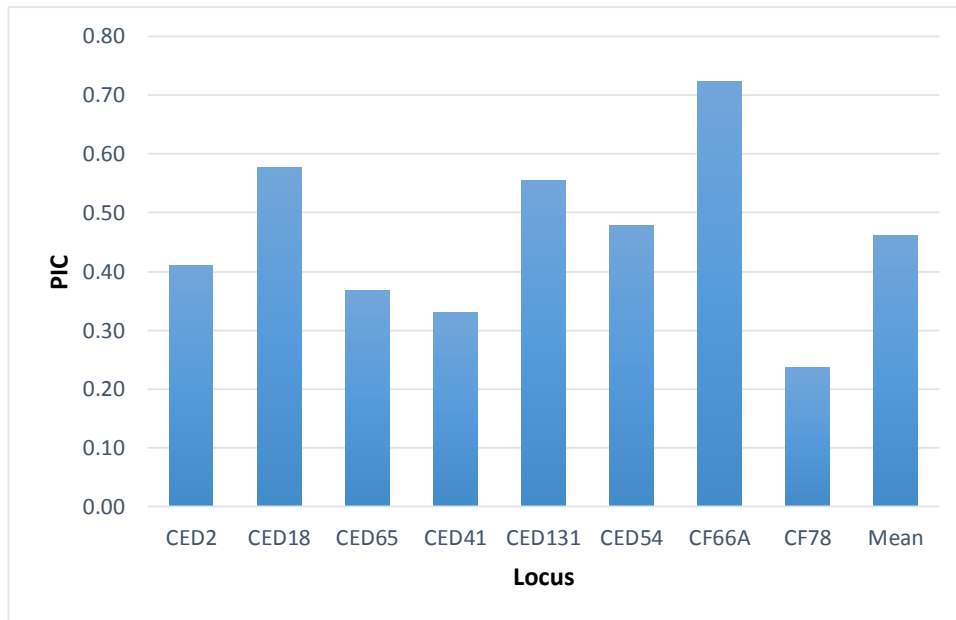
En total se encontraron 6 alelos raros los cuales pertenecían a los marcadores CED2, CED65 y CF66A.

Adicionalmente se observó que la población de Urubamba presenta un alelo privado (208) con una frecuencia de 0.125, en el locus CF66A.

### 6.3.3 Contenido de Información Polimórfica (PIC)

El Contenido de información polimórfica muestra un valor promedio 0.46 en la población total.

Los valores de PIC variaron entre 0.24 y 0.72, para los locus CF78 y CF66A respectivamente.



**Figura 11** Contenido de Información Polimórfica en los 8 locus

Los resultados mostraron que los marcadores CED18, CED131 y CF66A son altamente informativos PIC mayor a 0.5; mientras que los marcadores CED2, CED65, CED41 y CED54 son medianamente informativos (valores menores a 0.5 pero mayor a 0.25) solo el marcador CF78 tuvo un PIC ligeramente informativo (valor menor a 0.25)

### 6.3.4 Heterocigosidad

Se analizó la Heterocigosidad esperada (He) y la Heterocigosidad observada (Ho), por locus y se tuvo como resultado promedio de He 0.51 y una Ho promedio de 0.44 (**Tabla 4**), se analizó la diferencia entre He y Ho mediante el Test de homogeneidad de varianzas, llegando a la conclusión que no es estadísticamente significativa ( $P > 0.05$ ).

**Tabla 4** Estimación de la Heterocigosidad, calculada por locus.

Locus	He	Ho
<b>CED2</b>	0.44	0.54
<b>CED18</b>	0.65	0.59
<b>CED65</b>	0.40	0.28
<b>CED41</b>	0.42	0.43
<b>CED131</b>	0.61	0.39
<b>CED54</b>	0.51	0.39
<b>CF66A</b>	0.77	0.64
<b>CF78</b>	0.28	0.23
<b>PROMEDIO</b>	0.51	0.44

He= Heterocigosidad esperada, Ho= Heterocigosidad observada

Según Ott (1992) un marcador polimórfico es aquel que el H (heterocigosidad) es  $\geq 0.1$  y altamente polimórfico si el H es  $\geq 0.7$ , en este trabajo se determinó que los 8 marcadores utilizados fueron polimórficos, pero ninguno altamente polimórfico.



En el análisis por población: (**Tabla 5**)

- **Población 1**

La población de Abancay presentó un rango de He de 0 a 0.63, siendo la He mínima de los locus CED18 y CF78, mientras que la He mayor lo presentó el locus CED131.

- **Población 2**

En la población de Aymaraes el rango que presentó la He fue de 0 a 0.61, perteneciendo la He mínima al locus CF78, mientras que los locus CED18, CED54 y CF66A presentaron el valor máximo de He.

- **Población 3**

La población de Anta tuvo un rango de 0.28 a 0.65 de He, siendo el locus CF78 con menor He, mientras que el locus CED131 presentó la He más alta.

- **Población 4**

La población de Urubamba presentó un rango de He de 0.31 a 0.71, siendo la He mínima del locus CF78, mientras que la He mayor lo presentó el locus CF66A

- **Población 5**

En la población de Calca, el rango de He fue de 0.25 a 0.72, perteneciendo el rango mínimo al locus CED41 y el máximo al locus CED54.

- **Población 6**

La población de Quispicanchi presento el rango de He desde 0.15 a 0.63, siendo el locus CED65 quien presenta menor rango, contrario al locus CF66A el cual presentó el mayor rango.

En la mayoría de poblaciones el locus CF78 presento menor He, con excepción de las poblaciones 5 y 6.

**Tabla 5** Estimación de la Heterocigosidad, calculada para las 6 poblaciones, utilizando 8 locus.

Locus	Población 1 Abancay		Población 2 Aymaraes		Población 3 Anta		Población 4 Urubamba		Población 5 Calca		Población 6 Quispicanchi	
	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho
<b>CED2</b>	0.38	0.5	0.44	0.67	0.46	0.58	0.51	0.71	0.47	0.57	0.15	0.15
<b>CED18</b>	0	0	0.61	0.67	0.58	0.58	0.62	0.63	0.6	0.71	0.56	0.54
<b>CED65</b>	0.5	0	0.28	0.33	0.64	0.75	0.32	0.21	0.26	0.29	0.14	0
<b>CED41</b>	0.38	0.5	0.28	0.33	0.47	0.75	0.38	0.25	0.25	0.29	0.45	0.54
<b>CED131</b>	0.63	1	0.44	0	0.65	0.33	0.56	0.42	0.52	0.43	0.48	0.39
<b>CED54</b>	0.5	0	0.61	0.33	0.29	0.17	0.51	0.58	0.72	0.71	0.21	0.15
<b>CF66A</b>	0.38	0.5	0.61	1	0.62	0.5	0.71	0.63	0.64	0.71	0.63	0.69
<b>CF78</b>	0	0	0	0	0.28	0.33	0.31	0.29	0.41	0	0.20	0.23
<b>Promedio</b>	0.34	0.31	0.41	0.42	0.50	0.50	0.49	0.46	0.48	0.46	0.35	0.34

Como se puede apreciar en las tablas 3 y 4, el locus con menor He y Ho fue el CF78, mientras que la población con menor He y Ho fue de Abancay. Por el contrario, el locus CF66A y población de Anta, tuvieron mayor He y Ho.

### 6.3.5 Equilibrio Hardy – Weinberg (EHW)

La evaluación del EHW se realizó con el programa GENEPOP y se redujo el rango de confianza de un P-valor 0.05 a P-valor 0.006 realizando la prueba de corrección de Bonferroni para 8 loci.

Se tuvo como resultado promedio un EHW de 0.307, siendo los locus CED131, CED54 y CF66A menores al P-value 0.006 lo cual nos indica que no se encuentran en EHW. (**Tabla 6**)

Por otro lado, el análisis por población evidenció qué: (**Tabla 7**)

- La población 1 (Abancay), posee 3 locus (CED65, CED131 y CED54) sin desviación del EHW y 5 locus con valor no significativo.
- La población 2 (Aymaraes), tiene 5 locus (CED2, CED18, CED131, CED54 y CF66A) sin desviación del EHW y 3 locus con valores no significativos.
- La población 3 (Anta), posee los 6 locus sin desviación del EHW, y 2 locus con desviación del EHW (CED131 y CF66A).
- La población 4 (Urubamba) también presenta 2 locus con desviación del EHW (CED54 y CF66A) y 6 locus sin desviación del equilibrio.
- La población 5 posee los 8 locus sin desviación del EHW.
- La población 6 presenta 1 solo locus (CF66A) con desviación del EHW y 7 locus sin desviación del equilibrio.

**Tabla 6** Equilibrio de Hardy- Weinberg evaluado por locus.

Marcador	Prueba de probabilidad	Exceso de heterocigotos	Déficit de heterocigotos
<b>CED2</b>	0.987	0.0008	1
<b>CED18</b>	0.213	0.8895	0.1107
<b>CED65</b>	0.149	0.9939	0.0062
<b>CED41</b>	0.330	0.4974	0.506
<b>CED131</b>	0.004	0.9893	0.0107
<b>CED54</b>	0.001	0.9966	0.0034
<b>CF66A</b>	0.000	0.896	0.104
<b>CF78</b>	0.467	0.8063	0.2001

**Tabla 7** Equilibrio de Hardy- Weinberg evaluado por poblaciones

Locus	Población 1 Abancay	Población 2 Aymaraes	Población 3 Anta	Población 4 Urubamba	Población 5 Calca	Población 6 Quispicanchi
	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value	P-value
<b>CED2</b>	-	1	1	0.2516	1	1
<b>CED18</b>	-	1	0.2177	0.266	0.03	0.7857
<b>CED65</b>	0.335	-	1	0.0499	1	0.0412
<b>CED41</b>	-	-	0.0901	0.1146	1	1
<b>CED131</b>	1	0.1991	0.0022	0.0844	0.326	0.036
<b>CED54</b>	0.334	0.1992	0.0933	0.0005	0.349	0.119
<b>CF66A</b>	-	1	0.0022	0	0.1346	0.0013
<b>CF78</b>	-	-	1	1	0.0217	1

No significativo (-)

## 6.4 Análisis de la Estructura Poblacional.

### 6.4.1 Índice de Fijación.

Los valores obtenidos con el estadístico F por población tuvo un promedio de  $F = 0.046$  (tabla 8)

**Tabla 8** Índice de Fijación por población

Población	Índice de Fijación (F)
Abancay	0.067
Aymaraes	-0.025
Anta	-0.016
Urubamba	0.067
Calca	0.049
Quispicanchi	0.130
<b>Promedio</b>	<b>0.046</b>

El análisis del coeficiente de endogamia (Fis) mostró un promedio positivo de 0.046, lo que refleja una baja endogamia. Los loci que muestran un exceso de heterocigoto son CED2; CED18; CED41; CF66A. Mientras que el coeficiente de coancestría (Fst) fue igual a 0.164, asimismo el coeficiente general de consanguinidad (Fit) fue de 0.201 (tabla 9)

**Tabla 9** Índice de Fijación por locus

Locus	Fis	Fit	Fst
<b>CED2</b>	-0.325	-0.210	0.087
<b>CED18</b>	-0.053	0.147	0.190
<b>CED65</b>	0.260	0.388	0.173
<b>CED41</b>	-0.211	0.011	0.183
<b>CED131</b>	0.219	0.358	0.178
<b>CED54</b>	0.314	0.457	0.208
<b>CF66A</b>	-0.121	0.101	0.198
<b>CF78</b>	0.284	0.352	0.095
<b>Promedio</b>	0.046	0.201	0.164

Se calculó los valores de coeficiencia de coancestría  $F_{st}$  entre pares de localidades, en total se realizó 15 comparaciones. (Fig. 12)

	Abancay				
Aymaraes	0.152	Aymaraes			
Anta	0.129	0.102	Anta		
Urubamba	0.159	0.100	0.038	Urubamba	
Calca	0.196	0.105	0.084	0.039	Calca
Quispicanchi	0.172	0.111	0.055	0.052	0.071

**Figura 12:** Resultados del análisis  $F_{st}$  en pares por cada población.

Se encontró que 13 valores de  $F_{st}$  significativos ( $P < 0.05$ ) y 2 valores de  $F_{st}$  menores a 0.05. Por otro lado los distritos de Abancay y Aymaraes mostraron niveles de diferenciación genética por sus valores significativos ( $P > 0.05$ ), eso puede deberse a la poca cantidad de individuos evaluados en estos distritos. Además, las poblaciones que presentaron un  $F_{st}$  bajo son Calca y Urubamba ( $F_{st} = 0.039$ ) lo cual nos indica que las poblaciones son genéticamente similares.

#### 6.4.2 ANALISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

El análisis de AMOVA demostró que la mayor variación se encontró dentro de las poblaciones con un 92% y una menor variación entre poblaciones con un 8%.

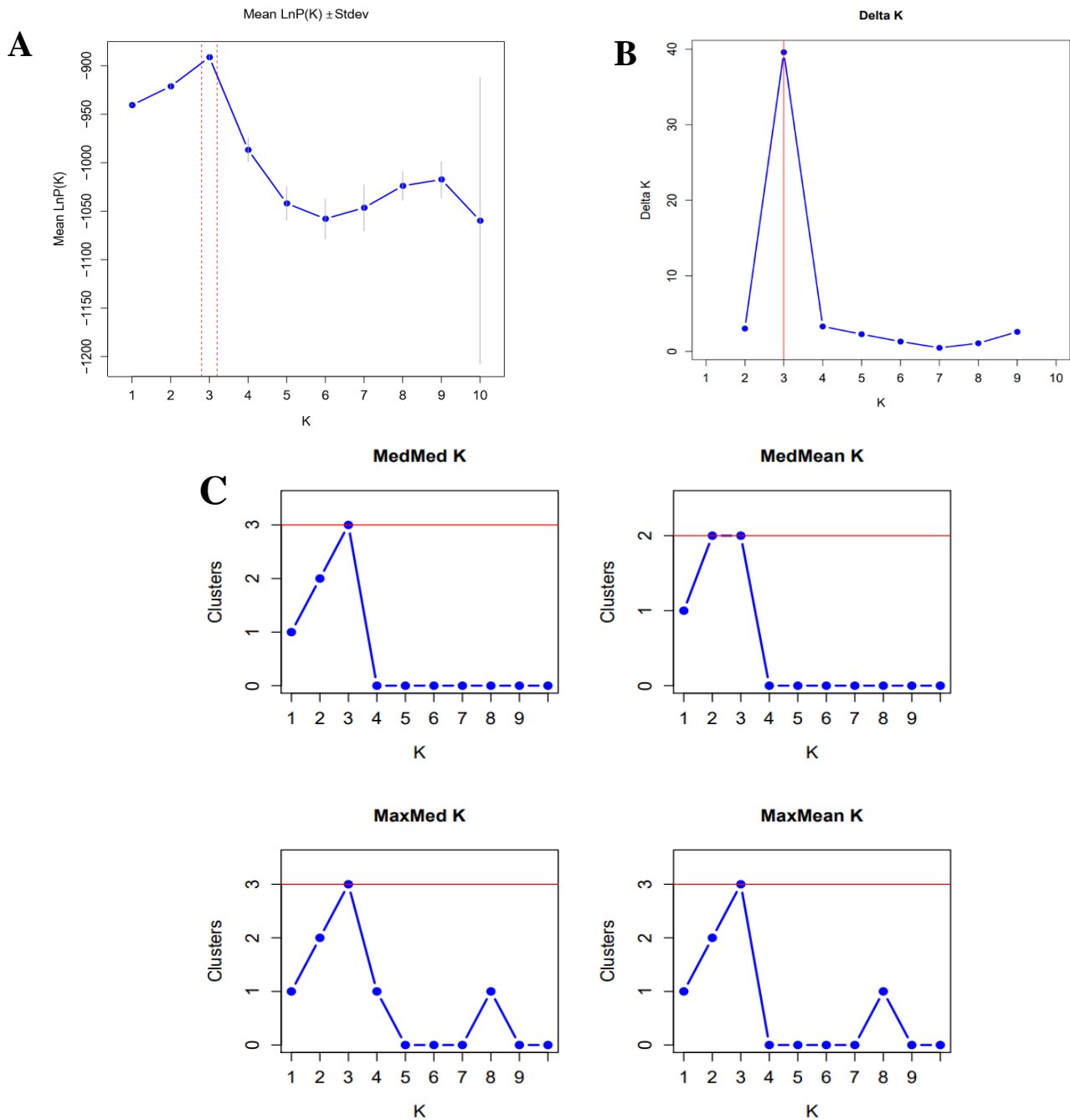
**Tabla 10** AMOVA

df= grados de libertad; SS suma de squares; MS= promedio de square; Est. Var = varianza estimada; %= porcentaje de variación.

Fuente	df	SS	MS	Est. Var.	%
Entre Poblaciones	5	25.348	5.070	0.172	8%
Dentro de Poblaciones	116	226.120	1.949	1.949	92%
Total	121	251.467		2.121	100%

### 6.4.3 Structure

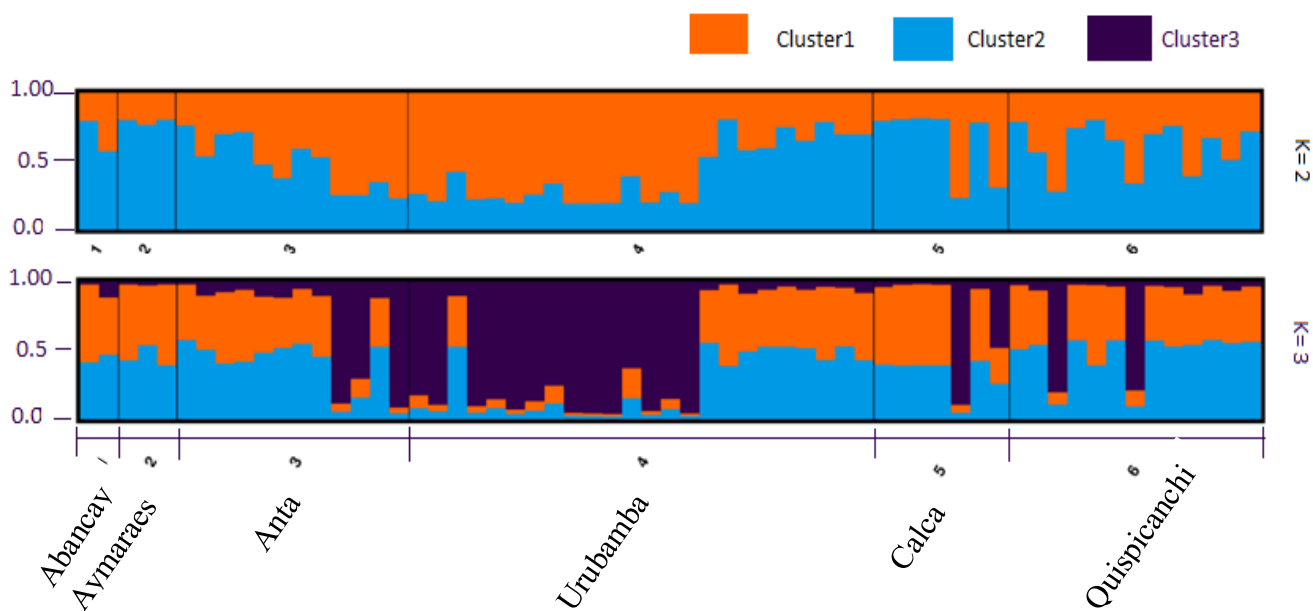
Con el programa Structure on the web, se evaluó tres métodos para hallar el mejor K (grupos genéticos). El método Pritchard indicó un  $k = 3$  (Fig.12A), al igual que el método de Evanno indicó un  $k = 3$  (Fig.12B), mientras que el método de Puechmaille indicó un  $k = 2-3$  (Fig.12C).



**Figura 12:** Resultados del programa Structure: (A) Método de Pritchard, (B) Método de Evanno y (C) Método de Puechmaille.

Se realizaron dos gráficos con los valores que se obtuvo de K (K=2 y 3). Para K=2, las provincias de Abancay, Aymaraes, Calca y Quispicanchi mostraron dominancia del clúster 2, mientras que la provincia de Urubamba presentó dominancia del clúster 1, finalmente la provincia de Anta mostró igualdad de clúster 1 y 2.

Para K=3 se mantuvo la dominancia del clúster 2 para las provincias de Abancay, Aymaraes y Quispicanchi, el clúster 3 aparece en todas las provincias distribuido en frecuencia variable, las provincias con menor clúster 3 son Abancay, Aymaraes, Calca y Quispicanchi, mientras que la provincia Urubamba presenta mayor dominancia del clúster 3.



**Figura 13:** Grafico de barras del programa Structure, según la asignación de clúster genéticos para la especie de Cedro en las 6 provincias Andinas.



## VII DISCUSIÓN

La cantidad promedio de ADN genómico de *C. angustifolia* que se obtuvo, utilizando el método Sunil Kumar-Sahu *et al.*, (2012) fue de 554.3 ng/ul (Max= 2,482.7ng/μl, Min=26.8ng/μl), con un valor de 1.9 en la relación de A260/280, similar resultado presentó SantaMaria (2015) quien trabajó con la especie *C. montana* y utilizó el protocolo convencional CTAB de Ferreira y Grattapaglia, pero tuvo inhibición de la amplificación del material genético, debido al material visiblemente oxidado. Esto posiblemente se debe a la presencia de metabolitos secundarios, terpenoides, alcaloides, fenoles, polisacáridos y aceites volátiles que interfieren en la extracción, tal como lo reporta Ribeiro y Lovaro (2007), ya que en especies forestales es común que presenten altos contenidos de polifenoles, lo cual dificulta la extracción, debido a que estos polifenoles se oxidan a quinonas por medio de las polifenoloxidasas, uniéndose covalentemente a las moléculas de proteínas y ácidos nucleicos, oxidándolas irreversiblemente, es por ello que en algunas ocasiones se puede observar el pellet de ADN de color marrón. (Mayer y Harel., 1979 y Sunil Kumar, *et al.*, 2012).

Es por esta razón que las extracciones de cedro se realizaron con el protocolo de Sunil Kumar *et al.*, 2012, con algunas variaciones (**anexo**), puesto que fue diseñado para especies con altos contenidos de metabolitos secundarios y polisacáridos.

El buffer de extracción que se utilizó, contiene el detergente catiónico CTAB al 2% el cual solubiliza las membranas celulares, y junto al NaCl a 1.5M forman un complejo con el ADN, lo cual hace precipitar al ADN selectivamente, además se utilizó el EDTA para inhibir enzimas dependientes de metales, principalmente las ADNasas ya que capta cationes bivalentes como  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ ; el PVP utilizado sirvió por su efecto antioxidante de compuestos fenólicos como taninos, quinonas, polifenoles, asimismo se utilizó el  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor, pues protege al ADN contra las actividades enzimáticas del polifenoloxidasa y peroxidasa, la explicación de los fundamentos de los reactivos utilizados son tomados de Ferreira y Grattapaglia, 1998.

La investigación sobre la diversidad genética de *Cedrela angustifolia* presentó algunas dificultades debido a que no hay muchos estudios sobre esta especie. A pesar de la importancia forestal y la condición de peligro de *C. angustifolia*, *C. balansae* y *C. saltensis* todavía no se dispone de microsatélites valiosos para estas especies (Soldati *et al.*, 2014), es por eso que para determinar la

diversidad genética se seleccionaron 13 marcadores moleculares, 9 transferidos de *C. odorata* (Hernández et al., 2008) y 4 transferidos de *C. fissilis* (Bertin Gandara, 2009).

Se eligió estos marcadores ya que el estudio de Soldati *et al.* (2014) evidencia que de 23 SSR de *C. odorata* y 10 SSR de *C. fissilis*, presentan una transferibilidad de 86.9% y 70% respectivamente para *C. angustifolia*. En comparación con el resultado obtenido en el presente estudio, de los 13 loci escogidos, en total solo amplificaron exitosamente 8 SSR, lo que representa el 33.3% de transferibilidad de *C. odorata* y el 50% de *C. fissilis*. Alguno de los motivos por lo cual no amplifico los 5 SSR puede deberse posiblemente a las mutaciones adquiridas que transformaron las regiones flanqueantes de los microsatélites, esta sospecha se puede corroborar a través de la filogenia. Según Penington y Muellner *et al.*, 2010 citado por Soldati et al., (2014) las especies de *C. angustifolia* y *C. saltensis* tiene una relación más distante filogénicamente con las otras especies de *Cedrela*, están más distantes del grupo compuesto por *C. fissilis*, *C. balansae* y *C. odorata*.

La amplificación de los SSR permitió determinar que los 8 marcadores evaluados era polimórficos, pero ninguno altamente polimórfico, sin embargo los marcadores utilizados en el presente trabajo difieren del nivel de amplificación de Soldati *et al.* (2014), sus marcadores CED18, CF66A y CF78 fueron monomórficos, mientras que CED65 y CED131 las bandas amplificadas no fueron específicas, solo se coincidió en la amplificación polimórfica de los marcadores CED2 y CED41, CED54, estas diferencias pueden deberse a que utilizaron muestras de cedro nativas de los bosques subtropicales de Argentina.

Cabe resaltar que debido al advenimiento de una creciente demanda de recursos naturales y la ampliación de fronteras agrícolas, cada vez se ejerce presión sobre los organismos vivos y el medio que los rodea (Reyes, 2018) no se encontró muchos individuos de *C. angustifolia*, en las regiones de Apurímac y Cusco durante el muestreo.

De los 8 loci reportados en este trabajo, se obtuvo un total de 32 alelos con tamaños que van desde 97pb a 226pb, cada locus presentó un número de alelo que varía entre 2 hasta un máximo de 7, siendo el locus CF66A el de mayor diversidad alélica, mientras que los locus CF78 y CED41 presentaron menor diversidad alélica, 2 alelos cada uno. El número total de alelos por locus fue de 4, otros estudios en *Cedrela* tuvieron valores diferentes de número de alelos ( $N_a$ ), el estudio de SantaMaría., 2015 presento para los mismos locus (CED41, CED65, CED131, CED54) un promedio de 12.25 alelos por locus, esto se debe a que la riqueza alélica está directamente relacionada al tamaño de la muestra (Via y Rada., 2015).

Las 6 poblaciones presentaron alelos en común (32), pero la población de Urubamba presente un alelo exclusivo de 208pb del locus CF66A, así mismo se encontraron alelos raros (frecuencia  $<0.05$ ) en las poblaciones, pero no se encontró ningún alelo muy raro (AmR). Según Hale *et al.*, 2012, en la cita de Acuña., 2015, es común encontrar alelos raros en estudios con microsatélites lo cual nos brinda información, en cambio los AmR no brindan información útil para la mayoría de análisis poblacional ya que puede deberse exclusivamente a mutaciones recurrentes y no al flujo génico. Si bien estos alelos exclusivos y/o raros no son útiles para análisis poblacionales, sí pueden ser útiles en programas de mejoramiento o conservación de la especie (Acuña., 2015).

Otro indicador de la diversidad genética es el PIC (Contenido de Información Polimórfica), según Botstein *et al.*, 1980, se considera que un locus tiene alta diversidad cuando el PIC  $>0.5$ , un locus de mediana diversidad tiene un PIC entre 0.5 y 0.25, mientras que los locus de baja diversidad tienen un PIC  $<0.25$ , los resultados del presente estudio mostraron que los marcadores CED18, CED131 y CF66A son altamente informativos PIC  $> 0.5$ , mientras que los marcadores CED2, CED65, CED41 y CED54 son medianamente informativos, solo el marcador CF78 tuvo un PIC ligeramente informativo PIC  $< 0.25$ , este último al no ser informativo no aportara al análisis de diversidad genética poblacional.

Con respecto a los niveles de heterocigosidad, la  $H_o$  vario de 0.313 hasta 0.5, mientras que la  $H_e$  vario de 0.34 a 0.35, así mismo en este trabajo la  $H_o$  promedio fue de 0.416 lo cual es menor que la  $H_e$  promedio = 0.430, las poblaciones que tienen menor  $H_o$  fueron Abancay, Urubamba, Calca, Quispicanchi (0.313; 0.464; 0.464 y 0.337 respectivamente). Según indica Eguiarte *et al.*, 2007 y Toro *et al.*, 2011 cuando la  $H_e > H_o$  es probable que se deba al exceso de homocigoto, es decir sea a causa de cruzamientos endogámicos en la población.

Los resultados del presente estudio ( $H_o = 0.416$  y  $H_e = 0.430$ ) concuerdan con otros estudios realizados con especies del mismo género, SantaMaria (2015) en Ecuador utilizó SSR en poblaciones de *Cedrela montana*, sus resultados muestran altos niveles de diversidad en  $H_o$  y  $H_e$  (0.597; 0.584 respectivamente). En comparación con estudios en *C. odorata*, éstas muestran menor diversidad genética, Leshner *et al.*, 2018, en su trabajo con SSR obtuvieron una diversidad genética baja  $H_o = 0.297$ , De la Torre., 2008, utilizando el marcador AFLP, tuvo una  $H_t = 0.22$  (Heterocigosidad esperada Total), Cavers *et al.*, 2003b utilizando marcadores AFLP y cloroplastidial obtuvieron un  $H_t = 0.27$ .

Por otro lado, la prueba de EHW con un P-value 0.006 considerando la corrección de Bonferroni y un P-value de 0.05, mostró que de los loci evaluados, el 37.5% se encontraban en desequilibrio (CED131, CED54 y CF66A), debido a que las poblaciones de *Cedrela* se encuentran drásticamente disminuidas por las actividades antropomórficas (clasificadas en el apéndice III de CITES) puede estar ocasionando que no se cumplan los supuestos del EHW.

Con respecto al análisis de la estructura poblacional, el presente estudio reporta alta diferenciación genética con SSR ( $F_{st}=0.164$ ) lo cual indica que la heterocigosidad poblacional se encuentra disminuida, ya que no hay mucho flujo genético. Sin embargo, esta diferenciación genética no fue muy alta, probablemente se deba al tipo de fecundación cruzada (Alogamas) ya que la polinización es por insectos y la dispersión de sus semillas es anemócora y sobrepasa los 40 metros de distancia del árbol progenitor, por lo que se le puede considerar como una especie con una relativamente alta dispersión de semillas (Leshner *et al.*, 2018). Por lo cual son consideradas especies simpátricas en sus distribuciones geográficas (Kristen *et al.*, 2019).

En cuanto a la variación del AMOVA dentro de las poblaciones fue de un 92%, lo cual concuerda con otros estudios realizados con especies del mismo género, De la Torre *et al.*, (2008) reportó valores moderados de diferenciación genética ( $F_{st}=0.20$ ) y un 72.7% de variación dentro de las poblaciones de Perú, al igual que poblaciones mexicanas de *C. odorata* estudiadas por Leshner *et al.*, 2018 indican una alta diferenciación genética ( $F_{st}= 0.419$ ) y una varianza de 42% entre poblaciones.

Sin embargo, no todas las especies del género *Cedrela* poseen una alta diferenciación genética, el estudio de Soldati *et al.*, (2013) en *Cedrela balansae*, reportaron baja diferenciación genética con SSR y AFLP ( $F_{st}= 0,049$  y  $0.041$  respectivamente).

Adicionalmente el análisis del coeficiente de endogamia (Fis) mostro un promedio positivo de 0.046, lo que refleja una baja endogamia. Los loci que muestran un exceso de heterocigoto son CED2; CED18; CED41; CF66A.

Para seguir analizando la estructura genética poblacional se realizó mediante el programa STRUCTURE la evaluación de los clúster (K). Estos clúster variaron de 2 a 3, sin embargo, el K=3

demonstró tener mayor concordancia con los análisis de AMOVA y  $F_{st}$ , estos resultados a su vez concuerdan con lo que se observó en el campo, la distribución geográfica (altitud), características ambientales (clima), actividades antropogénicas.

Por lo tanto, las poblaciones muestreadas tendrían alta diferenciación genética, lo cual indicaría que no se está conservando el acervo genético de las poblaciones de *C. angustifolia* por lo cual se necesita un programa de mejoramiento genético.

## VIII CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos podemos concluir

- Con el método estandarizado a partir del protocolo de Sunil Kumar-Sahu *et al.*, (2012), se alcanzó una extracción de ADN genómico de buena calidad y concentración ya que se obtuvo un valor de 1.9 en la relación de A260/280 y una concentración promedio de 554.3ng/ul.
- Se logró estandarizar el protocolo de amplificación para 8 de los 13 SSR. No todos los microsatélites de *C. odorata* y *C. fissilis* fueron transferibles debido a que las especies de *C. angustifolia* y *C. saltensis* tienen una relación más distante filogénicamente con las otras especies de *Cedrela*, están más distantes del grupo compuesto por *C. fissilis*, *C. balansae* y *C. odorata*.
- La población de *C. angustifolia* exhibió una baja diversidad genética, siendo más alta en la población de Urubamba.
- La diferenciación genética alta ( $F_{st} = 1.64$ ) entre las poblaciones, indica que la heterocigosidad poblacional se encuentra disminuida, ya que no hay mucho flujo genético.

## IX RECOMENDACIONES

- Realizar más muestreos de *C. angustifolia* en las regiones andinas, ya que la diversidad genética basada en la riqueza alélica está directamente relacionada con el tamaño de la muestra.
- Debido a la plasticidad fenotípica de las especies de *Cedrela* y la presencia de especies crípticas es recomendable realizar la técnica la del ADN Barcode, con marcadores como el MatK, rbcL o el ITS, para identificar plenamente a los individuos.
- Utilizar con precaución el método de transferibilidad de marcadores microsatélites, ya que *C. angustifolia* tiene una relación más distante filogénicamente con las otras especies de *Cedrela*, lo cual reduce el éxito en la transferencia.
- Utilizar más primer polimórficos como CED4a, CED27, los cuales fueron diseñados a partir de *C. odorata* en el INTA de Argentina por el investigador Carlos Navarro (trabajo no publicado).

## X REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albert, D., y Lopez, A. (2002). Consideraciones sobre el género *Cedrela* P. Browne (Meliaceae). In: Vazquez, M. Sociedad y Naturaleza en cuba I. Plantas útiles. La Habana, CU. 77-89p.
- Acuña, W. (2016). Determinación de la diversidad y estructura genética de patos criollos (*Cairina moschata* L. 1758) de los departamentos de Lambayeque y San Martín mediante el uso de microsatélites, UNMSM.
- Becker, V. (1973). Microlepidópteros asociados con Carapa, *Cedrela* y *Swietenia* en Costa Rica. (tesis de maestría). Instituto Interamericano de Ciencias de la OEA. Turrialba, Costa Rica.
- Bertin, F. (2009). Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae) no Centro-Sul do Brasil (Tesis doctoral). Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Botstein D., R.L. White, M. Skolnick, et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics 32: 314-331.
- Cardoso, S., Cuellar, J. (2016). Recuperación, ecología y silvicultura del cedro de altura (*Cedrela angustifolia*) en la región de cusco. En XII Congreso Nacional Forestal CONAFOR, Lima, Perú.
- Cavers, S., Navarro, C., y Lowe, A. (2003). A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, 4, 571-580.



Decreto Supremo 043-2006-AG. Diario oficial de la República del Perú. El Peruano.

De la Torre, A., López, C., Yglesias, E., y Cornelius, J. (2008). Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 255, 334-339.

De la Torre, A. (2013). Estructura poblacional, diversidad y flujo genético en poblaciones ribereñas de cedro (*Cedrela odorata* L.). En T. Groenendijk, y Wust (Eds). Reporte Manu 2013: Pasión por la investigación en la Amazonia peruana. (pp.80-97). Lima, Perú.

Eguiarte L, V Souza, X Aguirre. 2007. Ecología Molecular. UNAM. México. 592 p

Gillies, A., Cornelius, J., Newton, A., Navarro, C., Hernández, M., y Wilson, J. (1997). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, 6, 1133-1145.

Ferreira, M., Grattapaglia, D. (1998). Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Ministério da Agricultura e do Abastecimento –MA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnología – CENARGEN. Traducido al español por Javier Nicolás Fernández, Angeles Sánchez Herhampérez, Luján Rodríguez.

Grau, A., Zapater M., Neumann, R. (2006). Botánica y distribución del género *Cedrela* en el Noroeste de Argentina. En: Pacheco, S. y A.D. Brown (Eds.). Ecología y producción de los cedros (género *Cedrela*) en las Yungas australes. (pp.19-30). Tucumán, Argentina: Ediciones del Subtropical.

- Hernández, G., Buonamici, A., Walker, K., Vendramin, G., Navarro, C., y 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.
- Heywood, V. (1985). *Las plantas con flores*. Barcelona, España: Reverté.
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2016). Perú: Anuario de Estadísticas Ambientales.
- IUCN (Unión Mundial para la Conservación, UK). 1998. *Lista Roja de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestre*. Cambridge, UK. Consultado 24 de noviembre del 2018. Disponible en <https://www.iucnredlist.org>
- Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Consultado 2 de Junio 2018. Disponible en <https://www.itis.gov>
- Lombardi, I. (2014). *Las poblaciones del genero Cedrela en el Perú*. Lima, Perú: UNALM.
- Madesis, P., Ganopoulos, I., y Tsaftaris, A. (2013). *Microsatellites: Evolution and Contribution*. En: S. Kantartzi, (edit). *Microsatellites: Methods and Protocols*. Illinois (1-13). Illinois, USA: Humana Press.
- Ministerio del Ambiente. (2012). *Catálogo de Flora, Especies CITES peruanas*. Recuperado de: <http://www.minam.gob.pe/diversidadbiologica/wp-content/uploads/sites/21/2014/02/Catálogo-de-Flora.-Especies-CITES-Peruanas-1.pdf>
- Moreno, L. A. (2007). Tamaño efectivo de la población. En Equiarte, L. Souza V. Aguirre X. (Ed.), *Ecología Molecular* (pp. 63- 81). Mexico D.F., México.

- Niembro, A. (1995). Producción de semillas de cedro *Cedrela odorata* L. bajo condiciones naturales en Campeche, México. En Memorias del Simposio sobre Avances en la Producción de Semillas Forestales en América Latina. Rodolfo Salazar (Editor Técnico). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). p.p.215-228.
- Omar, S., Zhang, J., MacKinnon, S., Leaman, D., Durst, T., Philogene, B., Arnason, J., Sanchez-Vindas, P., Poveda, L., Tamez, P., y Pezzuto, J. (2003). Traditionally-used antimalarials from the Meliaceae. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3(2):133-139.
- Pennington, T.D. y Styles, B. T. (1975). A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea* 22, 419-540.
- Reyes, C. (2018). Caracterización y clave de identificación de las especies leñosas acompañantes de *Cedrela angustifolia* en Apurímac-Perú. (tesis) Universidad Nacional Agraria La Molina Facultad De Ciencias Forestales.
- Rocha, P. (2003) Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*, 24(2), 11-25.
- Saghai-Marroof, M.A., Soliman, K.M., Jorgensen, R.A., Allard R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc. Natl Acad Sci USA*. v.81(24). p.8014-8018.
- Santamaría, D. (2015). Estudio de variabilidad genética en poblaciones de Cedro de Montaña (*Cedrela montana* J. Moritz ex Turczaninov) y Porotón (*Erithryna edulis* Triana ex Michaelli) con marcadores SSR (Simple Sequence Repeats) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat) (tesis de pregrado). Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí. Ecuador.

- Schlötterer, C. (2000). Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365–371. doi: 10.1007/s004120000089
- Smith, C.E. (1960). A revision of *Cedrela* (Meliaceae). Chicago, USA: Fieldiana: Botany.
- Soldati, C., Fornes, L., Van, M., Thomas, E., y Zelener, N. (2013). An assessment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 47, 45–55.
- Soldati C., Inza M., 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. *Biochemical Systematics and Ecology*, 53, 8–16.
- Soldati, C., Fornés, L., Barth, S., Eskiviski, E., y Zelener N. (2014). Diversidad genética en poblaciones remanentes de *Cedrela fissilis* Vell. en la Selva Paranaense. En VI Reunión GEMFO. Buenos Aires, Argentina.
- Styles, B.T. (1981). Swietenioideae. En T. D. Pennington. (Ed.), A Monograph of Neotropical Meliaceae. (pp. 360- 384). New York, USA: The New York Botanical Garden.
- Sunil-Kumar Sahu, Muthusamy Thangaraj, Kandasamy, Kathiresan. (2012). DNA Extraction Protocol for Plants with High Levels of Secondary Metabolites and Polysaccharides without Using Liquid Nitrogen and Phenol. *ISRN Molecular Biology*. Volume 2012.

- Tijerino, A., Callejas, L., y Cerda-Granados, D. (2016). Assessment of Genetic Diversity in Five Nicaraguan Populations of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) using RAPD Markers. *Encuentro*, 103, 28-36.
- Toro M.A., T.H. Meuwissen, J. Fernandez, et al. 2011. Assessing the genetic diversity in small farm animal populations. *Animal* 5(11): 1669–83.
- Vázquez, A., Morales, A. (2014). Microsatélites. En Cornejo, A., Serrato, A., Aguilar, R., Rocha, G., (Ed.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. (pp. 75- 100)
- Veitch, N., Wright G., y Stevenson, P. (1999). Four new tetranortriterpenoids from *Cedrela odorata* associated with leaf rejection by *Exophthalmus jekelianus*. *Journal of Natural Products*, 62(9), 1260-1263.
- Vía y Rada Fernandez. (2015). Determinación de la Diversidad Genética de 172 accesiones de la colección nacional de *Chenopodium quinoa* Willd. “QUINUA” mediante marcadores microsatélites. (tesis pregrado) Universidad Ricardo Palma.
- Wang, M., Barkley, N., Jenkins, T. (2009). Microsatellite Markers in Plants and Insects Part I: Applications of Biotechnology. *Genes, Genomes and Genomics*, 3(1), 54-67.
- White, G., Powell, W. (1997). Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology*, 6, 1195-1197.
- Zane, L., Bargelloni, L., y Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11(1), 1-16.

## XI ANEXOS

**Anexo 1:** Datos de colecta de muestras de Cedro en la Región Apurímac y Cusco.

N°	Código	Región	Provincia	Distrito	Coordenadas		Altitud
1	Ced001	Apurímac	Aymaraes	Chalhuanca	S 14°17'27.5"	W 073°14'31.6"	2936
2	Ced002	Apurímac	Abancay	Lambrama	S 14°15'02.1"	W 073°17'56.2"	2838
3	Ced003	Apurímac	Aymaraes	Cuycua	S 14°12'38.7"	W 073°18'55.6"	2778
4	Ced004	Apurímac	Aymaraes	Colcabamba	S 14°00'08.9"	W 073°15'08.4"	3108
5	Ced005	Apurímac	Abancay	Tamburco	S 13°50'57.0"	W 072°58'36.3"	2582
6	Ced006	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°33'18.2"	W 072°33'54.3"	3039
7	Ced007	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°33'18.2"	W 072°33'54.3"	3128
8	Ced008	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°33'18.2"	W 072°33'54.3"	3105
9	Ced009	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'18.2"	W 072°32'19.6"	3107
10	Ced010	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°30'24.0"	W 072°31'46.7"	2923
11	Ced011	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°30'26.0"	W 072°31'47.6"	2914
12	Ced012	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'35.0"	W 072°25'39.3"	2720
13	Ced013	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'36.2"	W 072°25'41.2"	2704
14	Ced014	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'35.9"	W 072°25'41.3"	2705
15	Ced015	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'34.9"	W 072°25'41.3"	2708
16	Ced016	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'32.1"	W 072°25'25.5"	2744
17	Ced017	Cusco	Anta	Mollepata	S 13°27'32.6"	W 072°25'25.7"	2747
18	Ced018	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°16'27.5"	W 072°10'57.5"	2907
19	Ced019	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°16'27.6"	W 072°10'57.8"	2907
20	Ced020	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'14.6"	W 072°07'48.6"	2944

N°	Código	Región	Provincia	Distrito	Coordenadas		Altitud
21	Ced021	Cusco	Urubamba	Urubamba	S13°17'14.3"	W 072°07'48.4"	2944
22	Ced022	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°16'35.9"	W 072°07'31.7"	3039
23	Ced023	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°16'35.2"	W 072°07'31.1"	3041
24	Ced024	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°16'35.2"	W 072°07'30.9"	3041
25	Ced025	Cusco	Urubamba	Urubamba	S13°16'35.6"	W 072°07'30.2"	3042
26	Ced026	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'41.5"	W072°06'53.6"	2091
27	Ced027	Cusco	Urubamba	Urubamba	S13°17'40.2"	W 072°06'54.0"	2902
28	Ced028	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'39.7"	W 072°06'54.7"	2902
29	Ced029	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'53.5"	w 072°06'58.7"	2896
30	Ced030	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'51.0"	W072°06'39.4"	2920
31	Ced031	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°17'49.8"	W 072°06'39.0"	2926
32	Ced032	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°18'11.3"	W 072°07'01.6"	2881
33	Ced033	Cusco	Urubamba	Urubamba	S 13°18'16.9"	W 072°06'59.8"	2881
34	Ced034	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S 13°20'20.6"	072°03'47.5"	2933
35	Ced035	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S13°20'20.8"	W072°03'47.8"	2932
36	Ced036	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S 13°20'27.1"	W072°03'49.4"	2956
37	Ced037	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S13°20'26.8"	W 072°03'49.3"	2957
38	Ced038	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S 13°20'27.2"	W 072°03'49.5"	2957
39	Ced039	Cusco	Urubamba	Huayllabamba	S 13°20'09.5"	W 072°03'43.4"	2892
40	Ced040	Cusco	Urubamba	Yucay	S 13°18'55.7"	W 072°05'06.6"	2876
41	Ced041	Cusco	Urubamba	Yucay	S 13°18'55.8"	W 072°05'05.9"	2873
42	Ced042	Cusco	Calca	Calca	S 13°18'20.0"	W 072°06'40.2"	2869

N°	Código	Región	Provincia	Distrito	Coordenadas		Altitud
43	Ced043	Cusco	Calca	Calca	S 13°20'07.3"	W 071°56'53.2"	2950
44	Ced044	Cusco	Calca	Calca	S 13°20'08.1"	W 071°56'52.6"	2999
45	Ced045	Cusco	Calca	Coya	S 13°23'14.2"	w 071°54'21.3"	2971
46	Ced046	Cusco	Calca	Coya	S 13°23'12.5"	W 071°54'20.2"	2967
47	Ced047	Cusco	Calca	Coya	S 13°23'12.2"	W 071°54'20.3"	2967
48	Ced048	Cusco	Calca	Pisac	S 13°29'07.5"	W 071°48'10.0"	3269
49	Ced049	Cusco	Quispicanchi	Lucre	S 13°37'49.3"	W 071°44'03.5"	3126
50	Ced050	Cusco	Quispicanchi	Lucre	S 13°37'48.9"	W 071°44'03.0"	3125
51	Ced051	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'46.9"	W 071°47'05.1"	3170
52	Ced052	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'47.1"	W 071°47'05.1"	3168
53	Ced053	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'47.6"	W071°47'05.4"	3166
54	Ced054	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'48.0"	W071°47'05.6"	3163
55	Ced055	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'47.6"	W 071°47'05.2"	3163
56	Ced056	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'47.9"	w 071° 47'05.2"	3162
57	Ced057	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'48.1"	W 071°47'05.5"	3160
58	Ced058	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'48.3"	W 071°47'05.7"	3161
59	Ced059	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'49.2"	W 071°47'06.0"	3148
60	Ced060	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'49.4"	W 071°47'06.1"	3148
61	Ced061	Cusco	Quispicanchi	Oropesa	S 13°34'49.6"	W 071°47'06.1"	3145



**Anexo 2:** Preparación de soluciones utilizadas en la extracción de ADN.

**Buffer de Suspensión:**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>
Tris-HCl pH8	120mM
EDTA pH 8	50mM
NaCl	1M
Sucrosa	0.5M
triton -X 100	2%
$\beta$ mercaptoetanol	0.2%

**Buffer de extracción:**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>
Tris-HCl pH8	100mM
EDTA pH 8	20mM
NaCl	1.5M
CTAB	2%
$\beta$ mercaptoetanol	1%

**Buffer TE de alta concentración de Sal.**

<b>Reactivos</b>	<b>Concentración Final</b>
NaCl	0.5M
Tris - HCl	10mM
EDTA pH 8	1mM

### **Anexo 3: Protocolos**

#### **Protocolo de homogenización de las muestras**

- 1) Lavar los morteros y pilones, posteriormente enjuagarlos con agua destilada estéril.
- 2) Autoclavar los materiales y dejar secar. Enfriar los morteros y colocar las muestras (almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ ), posteriormente triturarlas con nitrógeno líquido.
- 3) Colocar las muestras trituradas en microtubos de 2ml y almacenar los microtubos a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

#### **Protocolo de extracción de ADN Sunil kumar Sahu *et al* - 2012 modificado para *Cedrela***

1. Colocar en un recipiente que contiene hielo, los microtubos con las muestras trituradas y pesar en una balanza analítica 100mg de tejido triturado en microtubos de 2ml y agregarle 20mg de PVP.
2. Pre calentar el buffer de suspensión (pH 8) a  $60^{\circ}\text{C}$ .
3. Agregar 0.8ml del buffer de suspensión a las muestras y mezclar por inversión e incubar a  $60^{\circ}\text{C}$  por 60min.
4. Centrifugar los tubos a 13,000rpm durante 15 min a temperatura de ambiente.
5. Agregar 1.2ml del buffer de extracción e incubar a  $60^{\circ}\text{C}$  por 60 min con movimiento intermitente.
6. Posteriormente centrifugar a 13,000rpm durante 15min a temperatura de ambiente,
7. Cuidadosamente transvasar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar el doble de volumen de cloroformo- alcohol isoamílico (24:1) e invertir los tubos gentilmente de 20 a 30 veces y posteriormente centrifugar a 13,000rpm durante 15min.
8. Repetir el paso número 7.
9. Agregar igual volumen de isopropanol y guardar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora y centrifugar a 13,000rpm durante 15min y descartar el sobrenadante.
10. Agregar al pellet, etanol al 70%, desprender el pellet cuidadosamente y centrifugar a 13,000rpm durante 10min. Eliminar el etanol y dejar secar el pellet a temperatura de ambiente o al vacío, hasta que se elimine completamente los restos de etanol.
11. Resuspender el buffer en 100ul de TE.

**Anexo 4:** Lista de 13 cebadores (sentido y antisentido) que se utilizó para determinar la diversidad genética en *Cedrela angustifolia*.

Autor	cebadores	Secuencia (5' - 3')
Hernández <i>et al.</i> , 2008 <i>C. odorata</i>	CED2	F: CACGACGTTGTAAAACGACTTTGCTTTGAGAAACCTTGT R: AACTTTCGAATTGGTTAAGG
	CED18	F: CACGACGTTGTAAAACGACCAAAGACCAAGATTTGATGC R: ACTATGGGTGGCACAACACTAC
	CED41	F: CACGACGTTGTAAAACGACTCATTCTTGGATCCTGCTAT R: GTGGGAAAGATTGTGAAGAA
	CED44	F: CACGACGTTGTAAAACGACACTCCATTAAGTCCATGAA R: ATTTTCATTCCCTTTTAGCC
	CED54	F: CACGACGTTGTAAAACGACGATCTCACCCACTTGAAAAA R: GCTCATATTTGAGAGGCATT
	CED61A	F: CACGACGTTGTAAAACGACCAATCAAACCAAAAATGGAT R: GCAAATTAACCAGAAAAACG
	CED65	F: CACGACGTTGTAAAACGACGAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R: GAGGTTTCGATCAGGTCTTGG
	CED95	F: CACGACGTTGTAAAACGACATTTTCATTCCCTTTTAGCC R: TTATCATCTCCCTCACTCCA
	CED131	F: CACGACGTTGTAAAACGACCTCGTAATAATCCCATTTCCA R: GGAGATATTTTTGGGGTTTT
Bertin Gandara 2009 <i>C. fissilis</i>	CF66A	F: CACGACGTTGTAAAACGACCAGCAGTTCTGAAACAGTAA R: ATTCAGCAACTTGAGAGC
	CF34	F: CACGACGTTGTAAAACGACGTTGGCAGCATGATTACC R: GAAGACTGTGTCTCTGAGTGG
	CF78	F: CACGACGTTGTAAAACGACGCCACAATATCTACTCTCAG R: GTTTCCTCTCTTGGGTTT
	CF83	F: CACGACGTTGTAAAACGACACCATTCGAGCCCACTACA R: GCCAAGGCAACCGAATCA

**Anexo 5.** Protocolo de amplificación para los cebadores seleccionados

Protocolo de PCR simple para marcadores: CF66A; CF34; CF78.

Reactivos	Concentración Inicial	Concentración final.	Volumen (1 Reacción)
Agua libre de nucleasas	-	-	2.23ul
Buffer kapa	5X	1x	2ul
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3mM	1.12ul
dNTPs	10uM	0.8uM	0.8ul
M13	1uM	0.06uM	0.6ul
Fw1	1uM	0.06uM	0.6ul
Rw1	1uM	0.04uM	0.4ul
BSA	10mg/ml	0.2mg/ml	0.2ul
Taq kapa	5 U/ul	0.0025U	0.05ul
ADN	10ng/ul	-	2
<b>total</b>	-	-	10

Protocolo de PCR dúplex para marcadores del primer grupo: CED-CED44; CED18-CED65; CED41-CED95; CED61a-CED131.

Componentes	Concentración Inicial	Concentración Final.	1 Reacción
Agua libre de nucleasas	-	-	1.55
buffer kapa	5 X	1x	2
MgCl <sub>2</sub>	25mM	3mM	1.2
dNTPs	10mM	0.2mM	0.2
M13	1uM	0.06uM	0.6
Fw1	1uM	0.06uM	0.6
Fw2	1uM	0.06uM	0.6
Rw1	1uM	0.04uM	0.4
Rw2	1uM	0.04uM	0.4
BSA	10mg/ml	0.4mg/ml	0.4
taq	5 U/ul	0.0025U	0.05
ADN	10ng/ul	-	2
<b>total</b>	-	-	10

**Anexo 6:** Condiciones programado en el termociclador para la amplificación.

Condiciones de PCR			
	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación Inicial	94°C	2 min	1
Denaturación	94°C	1 min	30
Hibridación	55°C	1 min	
Extensión	72°C	1 min	
Denaturación	94°C	30 seg.	10
Hibridación	53°C	30 seg.	
Extensión	72°C	30 seg.	
Extensión final	72°C	10 min	1
Hold	4°C	∞	-

**Anexo 7:** Condiciones de corrida electroforética capilar utilizando el analizador genético ABI 3130xl.

Parámetro	Valor
Temperatura de horno	60°C
Voltaje de pre-corrida	15°C
Tiempo pre-corrida	180 segundos
Voltaje de inyección	1.2 Kvoltios
Tiempo de inyección	50 segundos
Voltaje de corrida	15 Kvoltios
Tiempo de corrida por inyección	1140 segundos

### Allele Frequency

