

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Impacto de la degradación de habitat en la diversidad genética de dos poblaciones de

***Prestoea acuminata* (Wild.) H. E. Moore en el noroccidente de la Provincia de**

Pichincha

Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en

Ciencias Biológicas

ZADQUIEL VADIM ROVAINA RIVERA

Quito, 2014

Certifico que la disertación de Licenciatura en Ciencias Biológicas del Sr. Zadquiel Vadim Alejandro Rovaina Rivera ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Dr. Rommel Montúfar

Director de Disertación

Febrero de 2014

A mi Madre.....

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las entidades que hicieron posible esta tesis, la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, la Escuela de Ciencias Biológicas y al Proyecto Palmas por proporcionar las facilidades económicas e investigativas para éste trabajo. Así también, agradezco específicamente al Dr. Rommel Montúfar por su guía, consejo y apoyo.

Agradezco de manera muy especial a mi madre por su amor incondicional, guía y por mostrarme que los sueños se pueden realizar, a mi padre por su fuerza espiritual y fe en mí y a mi abuela Mamacarla por darme los mejores momentos de mi vida. A Ana Troya por su esencial ayuda y sincera amistad y muy especialmente a mi compañera de vidas Rosita Aguinaga por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles.

A mis compañeros de trabajo Andrés Recalde, Andrea Pinos, Sebastián Escobar, Gabriel Rivadeneira por brindarme su ayuda y apoyo en la realización de esta investigación.

A mis hermanos Vanessa, Sidartha, Gitanjaly, Ratziel y Shanresis que siempre creyeron y creen en mí.

A mis amigos tan apreciados; Karina Gómez, Francisco Córdova, Ramón Zambrano, Marco Orozco, Andrés Garcés, Esteban Chuang, Miguel Montoya que vivieron junto a mí los mejores y peores momentos y me mostraron el verdadero significado de la amistad. Gracias por todos los instantes que forman parte de mí y son inolvidables.

Y con gran afecto a todas las personas que me ayudaron y que forman parte de esta institución, personas que trabajan día a día con la mejor actitud, que nos enseñan con el ejemplo a ser profesionales y más importante aun a ser verdaderos seres humanos.

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCIÓN	5
3.1 IMPACTO DE LA DEGRADACIÓN FORESTAL EN LOS BOSQUES ANDINOS .	5
3.1.1 La diversidad y degradación de los bosques andinos.....	5
3.1.2 Factores adversos y amenazas que causan la degradación de los bosques	7
3.2 EFECTOS DE LOS CAMBIOS POR LA DEGRADACIÓN EN LOS BOSQUES ANDINOS	12
3.3 LAS PALMAS COMO COMPONENTES IMPORTANTES PARA LOS BOSQUES	15
3.3.1 <i>Prestoea acuminata</i> (Wild) H. E. como objeto de estudio.....	16
4. OBJETIVOS	19
4.1 General.....	19
4.2 Específicos.....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1 Área de estudio	20
5.2 Metodología.....	21
5.2.1 Recolección de muestras	21
5.2.2 Extracción y obtención de ADN	22
5.2.3 Amplificación de marcadores microsatelites (SSRs).....	24
5.2.4 Análisis estadísticos	27
6. RESULTADOS	32
6.1 Obtención de ADN.....	32
6.2 Fase molecular.....	32
6.2.1 Amplificación.....	32

6.3 Análisis estadísticos.....	33
6.3.1 Desequilibrio ligado y equilibrio Hardy-Weinberg	33
6.3.2 Análisis de la diversidad genética entre poblaciones: bosque disturbado (BD) vs bosque no disturbado (BnD)	34
6.3.3 Estructura genética entre cohortes para las dos poblaciones (BD y BnD).....	35
7. DISCUSIÓN	37
7.1 Efecto del estado de conservación del bosque en la diversidad genética.....	37
7.2 Dinámica de la diversidad genética en el bosque disturbado	41
7.3 Dinámica en la diversidad en bosque no disturbado	43
8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
8.1 Conservación y manejo de bosques.....	45
9. LITERATURA CITADA.....	48
10. FIGURAS	64
11. TABLAS	73
12. ANEXOS	81
13. GLOSARIO.....	87

FIGURAS.

- Figura 1.** Individuo juvenil de *Prestoea acuminata*. Flores y frutos de la palma. 65
- Figura 2.** Mapa de las dos localidades seleccionadas por diferentes niveles de impacto humano: Reserva Inti Llacta, Nanegalito, 00°02'N, 78°43'W (Bosque disturbado), y Reserva Río Bravo, 00°04'S, 78°44'W (Bosque no disturbado)..... 66
- Figura 3.** Verificación de calidad y cantidad de ADN en un gel de agarosa al 1% para algunas muestras de plántulas, juveniles y adultos de *P. acuminata*, población de Inti Llacta 67
- Figura 4.** Gel de agarosa al 3% para la amplificación del primer AG5-5#6 (*Euterpe edulis*) en 23 individuos de *P. acuminata* en la población de Inti Llacta..... 67
- Figura 5.** Amplificación en gel de poliacrilamida al 6% del locus Ob22 (Microsatélite más polimórfico) para juveniles y plántulas de la población de Inti Llacta (bosque disturbado) 68
- Figura 6.** Frecuencias alélicas de todos los Loci por cohorte en la población de Río Bravo (bosque no disturbado, n=80). 69
- Figura 7.** Frecuencias alélicas de todos los Loci por cohortes en la población de Inti Llacta (bosque disturbado, n=90) 70
- Figura 8.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con la distancia genética de Nei para las tres cohortes (adultos, juveniles y plántulas) en las dos poblaciones: Inti Llacta (BD) y Río Bravo (BnD) 71
- Figura 9.** Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con los índices *Fst* y Nei (1972) para las tres cohortes (adultos, juveniles y plántulas) en las dos poblaciones: Inti Llacta (BD) y Río Bravo (BnD). 71
- Figura 10.** Grafico de Bottleneck para todos los estadios basado en la frecuencia alélica de los seis loci para las dos poblaciones (Inti Llacta, n=90 y Río Bravo, n=80) 72

TABLAS.

Tabla 1. Primers amplificados bajo el protocolo PCR original	74
Tabla 2. Valores de probabilidad obtenidos para el desequilibrio ligado (linkage disequilibrium), bajo una significancia de 0.05 y 0.01 de todos los locus para la población de Inti Llacta (bosque disturbado) y Río Bravo (bosque no disturbado).	75
Tabla 3. Análisis de desequilibrio ligado (Linkage disequilibrium) por cohortes para la población bosque disturbado y de bosque no disturbado para todos los loci.	76
Tabla 4. Número de alelos absolutos (A_o) por las dos poblaciones analizadas, bosque disturbado y bosque no disturbado.	76
Tabla 5. Sumatoria de alelos privados con sus respectivas frecuencias entre las dos poblaciones (bosque disturbado y bosque no disturbado)	77
Tabla 6. Número de muestras, Riqueza alélica (R_s), número efectivo de alelos, promedio de heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia F_{is} y % de alelos polimórficos en los seis loci para las dos poblaciones; Inti Llacta (Bosque disturbado) y Río Bravo (Bosque no disturbado), de <i>P. acuminata</i>	77
Tabla 7. Análisis de cuello de botella bajo el modelo Probabilístico Two-Phases Model (T.P.M.) para los diferentes cohortes (adultos, juveniles y plántulas) entre dos poblaciones (bosque disturbado y bosque no disturbado)	78
Tabla 8. Número de alelos absolutos (A_o) por cada cohorte por locus en cada población analizada	78
Tabla 9. Número de alelos privados y alelos efectivos para las dos poblaciones Bosque disturbado y Bosque no disturbado.....	78
Tabla 10. Número de muestras, riqueza alélica (R_s), promedio de heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada de Neil (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{is}) para seis loci en las dos poblaciones; Inti Llacta (bosque disturbado) y Río Bravo (bosque no disturbado), para adultos (A), juveniles (J) y plántulas (P) de <i>P. acuminata</i>	79
Tabla 11. Relación genética para el flujo promedio migratorio en los diferentes cohortes (plántulas, juveniles y adultos) para el número de migrantes (Nm).....	79
Tabla 12. Diferenciación genética en los diferentes cohortes (plántulas, juveniles y adultos) basada en los índices de fijación (F_{st}).....	80

ANEXOS.

ANEXO 1. Número de individuos de <i>Prestoea acuminata</i> recolectados para los análisis moleculares.	82
ANEXO 2. Reactivos	83
2.1 Reactivos para extracción de ADN según el protocolo Doyle & Doyle (1987)	83
2.2 Reactivos para realización de geles y lectura.....	83
2.3 Reactivos para la tinción de geles	84
ANEXO 3. Primers polimórficos utilizados en <i>P. acuminata</i> con su respectivo protocolo de PCR.	86

1. RESUMEN

Los bosques Andinos son considerados ecosistemas megadiversos ya que concentran alta diversidad y endemismo debido a la gran variedad de nichos ecológicos y su historia geológica. Sin embargo, estos ecosistemas se encuentran amenazados por las actividades humanas y disturbios ambientales que afectan la estructura genética y dinámica poblacional de las especies. *Prestoea acuminata* (Palmito de Castilla; Arecaceae) constituye un importante elemento florístico en la dinámica de los bosques montanos, por ello se la utilizó como modelo para analizar el efecto del disturbio humano en la dinámica genética de algunas poblaciones de esta especie. Con el objetivo de analizar la estructura genética de las poblaciones naturales de *P. acuminata*, se escogieron dos áreas de estudio: a) reserva privada Inti Llacta, en el área de Nanegalito (Distrito Metropolitano de Quito), como ejemplo de un bosque disturbado (BD) y b) reserva privada Río Bravo en el área de Mindo (Cantón San Miguel de los Bancos) como ejemplo de bosque no disturbado (BnD). Dentro de cada población fueron identificados tres cohortes/estadios (adultos, juveniles y plántulas), en donde cada uno representa eventos temporales de flujo génico de acuerdo a la edad estimada de cada cohorte. De esta manera se analizó la diversidad genética temporal entre cohortes y el estado genético espacial entre poblaciones para esta especie. Se utilizaron seis microsatélites (SSRs) polimórficos para analizar la diversidad genética (A_o , H_e , H_o) y estructura y diferenciación genética (F_{is} - F_{st} , número de migrantes y cuello de botella). Los resultados mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas entre las dos poblaciones (BD y BnD). Para la población de BD se encontró una mayor diversidad genética y mayores niveles de endogamia, en comparación al BnD donde los niveles de diversidad y endogamia fueron menores. La mayor diversidad

genética encontrada en Nanegalito (BD) puede deberse a su posición geográfica privilegiada, sin embargo los niveles de endogamia encontrados indican el grado de impacto a la cual el bosque de Nanegalito ha estado sometido en las últimas décadas. La distancia genética y el índice de fijación (F_{st}) muestran una alta similaridad genética, demostrando que a pesar de los diferentes niveles de impacto humano existe flujo génico entre las poblaciones. El efecto de la degradación sobre los bosques perturba la dinámica en interacciones planta-animal provocando posiblemente la degradación de los ecosistemas naturales que es necesario conservar.

Palabras clave: bosque nublado, conservación, diversidad genética, estructura genética, endogamia, microsatélites, *Prestoea acuminata*.

2. ABSTRACT

The Andean forests are considered mega diverse ecosystems because of their highest diversity and endemism due to the wide variety of ecological niches and its geological history. However, these ecosystems are threatened by human activities and environmental factors that alter the ecology and produce degradation that, consequently, changes the genetic structure and population dynamics of all species. *Prestoea acuminata* (Red Crownshaft Palm; Arecaceae) is an important floristic element in the dynamics of the montane forests, so it was used as an indicator species to analyze the effect of human disturbance. The analysis was focused on the genetic dynamics of two populations of this species. In order to analyze the genetic structure of natural populations of *P. acuminata*, two reas of study were chosen: a) a private reserve Inti Llacta within the Nanegalito area, (Distrito Metropolitano de Quito) as an example of a disturbed forest (DF) and b) a private reserve Rio Bravo within Mindo area (Canton San Miguel de los Bancos) as an example of an undisturbed forest (UF). Within each population, three cohorts/stages were identified (adults, juveniles and seedlings), with each of them representing a temporal gene flow event according to the estimated age of each cohort. In this process, the temporal genetic diversity between cohorts and spatial genetic status between populations for this species were analyzed. Six polymorphic microsatellite simple sequence repeats (SSRs) were used to analyze genetic diversity (A_o , H_e , H_o), structure and genetic differentiation (F_{is} – F_{st} , N_m , Bottleneck). The results demonstrated that there were significant differences between the two populations (DF and UF). The *P. acuminata* population within the DF showed greater genetic diversity and higher levels of inbreeding, compared to UF where diversity and inbreeding levels were found to be lower. The greater genetic diversity found in Nanegalito (DF) may be due to its geographic location, but the inbreeding levels that were

found indicate the degree of impact which Nanegalito forest has been subjected to in recent decades. Genetic distance and fixation index (F_{st}) showed high genetic similarity, demonstrating that despite the different levels of human impact there is gene flow between populations. The effect of degradation on forests disturbs the dynamics on the plant-animal interactions causing a continuous change of genetic diversity, possibly leading to the degradation of the natural ecosystems that need to be conserved.

Keywords: conservation, cloud forest, genetic diversity, genetic structure, inbreeding, microsatellite, *Prestoea acuminata*.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 IMPACTO DE LA DEGRADACIÓN FORESTAL EN LOS BOSQUES ANDINOS

3.1.1 La diversidad y degradación de los bosques andinos

Según la FAO (2010), la degradación ambiental se define como la reducción del potencial de un bosque de proveer beneficios en un tiempo determinado, entre los cuales incluye carbón, madera, biodiversidad y otros bienes y servicios ambientales. Un bosque degradado es un bosque secundario que ha perdido, a través del impacto humano y causas naturales, su estructura, función, composición de especies o productividad asociada normalmente con las expectativas naturales esperadas del bosque (UNEP, 2001).

Los indicadores para determinar el estado de degradación de un bosque varían según metodologías, ya que no es posible establecer un cuadro preciso o único para determinar el nivel de degradación (FAO, 2009). Entre los indicadores más utilizados según (FAO, 2009) se incluyen: densidad de las reservas naturales, bosque/cobertura de copas, desaparición de la biodiversidad/especies, ocupación/dominación de especies invasoras/introducidas, erosión, hábitats de animales salvajes, producción/valor de la madera, fertilidad de suelo, composición de las especies, áreas afectadas por el fuego, nivel de fragmentación, presencia de especies pioneras y calidad de agua. Sin embargo, otro indicador sugerido para determinar el nivel de degradación de un bosque es la diversidad genética (FAO, 2010; Williams *et al.*, 2007; Schaberg *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006; Namkoong *et al.*, 1996), ya que la heterocigosidad y una abundante diversidad alélica son algunos factores que aseguran en una especie una resiliencia óptima para sobrellevar

cambios ambientales y perturbaciones en el equilibrio natural de los ecosistemas (Thomson *et al.*, 2009; Tylianakis *et al.*, 2008).

Los Andes Tropicales son un ecosistema mega diverso (Myers *et al.*, 2000). Con un gran endemismo debido a la gran variedad de nichos ecológicos y su historia geológica. Este ecosistema presenta formaciones vegetales únicas en el mundo, tanto por su composición florística como por las particularidades evolutivas que han favorecido los altos niveles de endemismo y diversidad biológica (Grubb y Whitmore, 1966). En los bosques andinos del Ecuador existen gran cantidad de especies animales, entre estas; más de 1600 especies de aves (Brumfield y Caparella, 1996; Cheviron *et al.*, 2005; Herzog y Kattan, 2013; Ridgely y Greenfield, 2006; Weir, 2009), alrededor de 539 especies de anfibios (Bernal *et al.*, 2005; Ron *et al.*, 2013; Weigt *et al.*, 2005), 4000 especies de mariposas (Brower, 1994; Willmott *et al.*, 2010), 215 especies de serpientes (Torres *et al.*, 2013; Zamudo y Greene 1997) 411 especies reportadas de mamíferos (Burneo y Boada, 2012; Hoffmann y Barker, 2003); de 20 a 30 mil especies de plantas (Anderson *et al.*, 2013; Ríos *et al.*, 2007) y alrededor de 1050 especies de orquídeas a lo largo de los andes (Revelo 2002; Ternel *et al.*, 2008). Lamentablemente, el nivel de deforestación y degradación de los Andes Tropicales también es alta. Según cifras del Ministerio del Ambiente la tasa de deforestación actual en el Ecuador llega a 70.000 ha/año incluyendo los remanentes de bosque montano que aun existen, con un error de cálculo estimado del 30 % (REDD+, 2012). En las vertientes occidentales de los Andes la tasa de deforestación llega a las 9.027 ha/año (Ministerio del Ambiente, 2012).

El Ecuador es considerado un país megadiverso (Myers *et al.*, 2000), y por lo tanto, se debe tomar en cuenta la importancia de los ecosistemas y el aporte que estos tiene en las

sociedades modernas. La Convención de Patrimonio Mundial de las Naciones Unidas (The United Nations World Heritage Convention, WHC) catalogó al noroccidente de Ecuador como zona clave para conservar y restaurar, ya que cuenta con un alto número de especies y es una zona considerada como “irreemplazable” (Le Saout *et al.*, 2013).

3.1.2 Factores adversos y amenazas que causan la degradación de los bosques

Los factores que pueden causar degradación e impacto a estos ecosistemas pueden ser antropogénicos y naturales.

Factores antropogénicos

Los factores antropogénicos que conllevan a la degradación de los bosques pueden ser clasificados como directos (explotación forestal excesiva, fragmentación, tala, pastoreo, agricultura); e indirectos (especies invasoras o plagas, construcción de carreteras) (FAO, 2009). De igual manera, existen factores subyacentes que contribuyen a la degradación de bosques como: la pobreza, falta de alternativas y oportunidades económicas, políticas inadecuadas, carencia de derechos de arriendo claramente establecidos, debilidades institucionales, falta de recursos financieros, corrupción, diversos factores económicos, tecnológicos, culturales y demográficos entre otros (REDD+, 2012).

La deforestación y fragmentación tienen un rol importante como factor principal en la degradación de los bosques. El Ministerio de Ambiente junto con REDD+ (The United Nation Collaborative Programme on Reducing Emissions from Deforestation and Forest Degradation in Developing Countries, 2012) identificaron los motivos que conllevan a la

deforestación en el Ecuador, entre ellas se mencionan:

- 1) La expansión del sector agrícola y ganadero, el mercado del banano (1955) y la Reforma Agraria en el Ecuador (1950-1960); estos factores forzaron a muchos agricultores y ganaderos a asentarse en áreas frágiles de zonas montañosas. Según Sierra (2001), la población en las ciudades en el Ecuador creció del 40 al 65% entre 1974 y 2001, mientras que, la población rural alcanzaba el 39% y con ello el incremento de zonas agrícolas y ganaderas. Este incremento tiene un fuerte impacto en los ecosistema ya que grandes extensiones de bosques han sido convertidas en pastizales para la alimentación del ganado (Rhoades, 2001). La alimentación del ganado bovino tiene un efecto negativo en la vegetación. Se ha calculado que una res consume alrededor de 77 kg de pasto al día (100 m²/res) (Bargo, 2008). El tipo de pasto que utilizan para alimentar al ganado a menudo son especies introducidas (*Phalaris arundinacea*, *Cynodon dactylon* y *Festuca arundinacea*) que destruyen el medio ambiente por su capacidad de dispersión y compiten con especies nativas por territorio, desplazándolas y en algunos casos eliminándolas (Rhoades, 2001).
- 2) La tala selectiva, según cifras del Ministerio de Ambiente Ecuador (2011), la tala legal en el Ecuador llega a los 2'901.666,93 m³/año representando un 62,81% del total de la madera proveniente de plantaciones forestales, 22,96% proveniente de plantaciones nativas y el resto (14,23%) es de origen de formaciones pioneras (bosques secundarios). Sin embargo, las cifras exactas sobre la tala ilegal son desconocidas. Según Sierra (2001), la tala indiscriminada constituye la principal causa de deforestación en el occidente del Ecuador seguido de la expansión de la agricultura.
- 3) Exploración y explotación de petróleo, minería y desarrollo de producción de energía; estos factores contribuyen directa e indirectamente a la degradación de este ecosistema ya que desestabilizan los suelos, causan deforestación, pérdida de biodiversidad, pérdida de nacimientos de agua, contaminación del agua a través de desechos químicos y efectos

secundarios de la extracción de minas y del aire a través de la quema de gas y por la quema de crudo en piscinas (REDD +, 2012).

Otro efecto de la deforestación es evidente sobre la dinámica hídrica en los bosques nublados (Ataroff y Rada, 2000). Con la deforestación ocurre un cambio en la tasa de evapotranspiración, ya que los procesos internos (transpiración-respiración) de la vegetación depende, en parte, de la cantidad de biomasa foliar o índice de área foliar (Frumau *et al.*, 2006). La deforestación produce cambios en la capacidad de los suelos para almacenar y retener la humedad, ya que los suelos de los bosques andinos, son en su mayoría derivados de ceniza volcánica y con un alto contenido de materia orgánica. Esta característica es responsable de su alta capacidad de almacenamiento, y al desaparecer la vegetación, la materia orgánica desaparece rápidamente por descomposición acelerada y por ende disminuye la capacidad de almacenamiento del agua; lo que afecta la disponibilidad de agua para las plantas y la evapotranspiración. Finalmente, ocurre erosión y pérdida de las propiedades del suelo (Tobón y Morales, 2007).

La fragmentación es otro de los factores que generan degradación y afectan la dinámica y estructura de los bosques andinos. Esta consiste en la reducción del tamaño de la población y el incremento del aislamiento (Sauders *et al.*, 1991; Van *et al.*, 2004), y ocurre por acciones antropogénicas directas o indirectas (FAO, 2009). Dos efectos principales de la fragmentación son la alteración de los microclimas entre y dentro de los remanentes (efecto de borde) y el aislamiento que existe entre los parches y sus alrededores (Sauders *et al.*, 1991).

Las alteraciones microclimáticas resultan en cambios físicos en niveles de radiación, vientos y agua, produciendo efectos importantes en los remanentes o parches de bosque (Sauders *et al.*, 1991). La remoción de vegetación nativa para el remplazo por tierras de agriculturas o pastizales altera el balance de radiación cambiando la dinámica de temperatura natural del habitat (Aguirre y Dirzo, 2007). Muchas especies de sombra son restringidas a la parte interior de los remanentes, mientras que la composición vegetal y faunística de los remanentes de borde se ve afectada por el efecto de borde (Sauders *et al.*, 1991). El proceso cíclico de los nutrientes puede afectarse por el incremento calórico en los suelos, perturbando a microorganismos descomponedores y invertebrados (Klein, 1989). Cambios en la radiación afecta la fauna alterando las interacciones en la cadena trófica (planta-herbívoro) y la supervivencia de las especies; ya que muchos animales dependen de especies nativas y la fragmentación altera los recursos naturales conllevando a la degradación del ecosistema (Baz y Boyero, 1995).

La exposición de los remanentes al viento por causa de la fragmentación puede causar daños a la vegetación, ya sean daños físicos directos o a través del incremento de la evapotranspiración, la cual, reduce el nivel de humedad incrementando la desecación (Sauders *et al.*, 1991). Los árboles cerca del borde que han sido recientemente expuestos se encuentran particularmente más vulnerables, ya que no han desarrollado la madurez suficiente (edad para desarrollo de raíces) para soportar los efectos del viento (Altamirano *et al.*, 2007). El viento puede depositar semillas de especies no nativas desde distancias considerables hasta los remanentes de bosques, e incrementar la transferencia de insectos y plagas (Sauders *et al.*, 1991).

La fragmentación también afecta el movimiento de especies a través de los remanentes. El tamaño de los organismos es un factor que delimita el movimiento o la migración de un remanente a otro (Klein, 1989; Baz y Boyero, 1995). Un campo de agricultura es suficiente barrera para impedir la dispersión de invertebrados y de algunas especies de aves (Saunders *et al.*, 1991). La persistencia de las especies en los remanentes dependerá enteramente de la capacidad del habitat de mantener un número suficiente de la población, para evitar el riesgo de extinción (Saunders *et al.*, 1991; Schaberg *et al.*, 2008). Los remanentes de bosques de mayor tamaño poseen mayor área interna que no se ve afectada por los factores ambientales y bióticos asociados al efecto de borde (Saunders *et al.*, 1991; Murcia, 1995). Por lo tanto, usualmente contienen una mayor diversidad que los remanentes pequeños; sin embargo para algunas especies, un mosaico de remanentes pequeños puede tener una serie de habitats que en conjunto y a través del intercambio migratorio poseen mayor diversidad (Scariot, 1999; Sauder *et al.*, 1991).

Factores Naturales

Los factores naturales también juegan un papel importante en la dinámica de los bosques andinos (Leyva, 2001). El cambio climático es un factor que está cambiando la dinámica de los bosques nublados a través de efectos como: 1) el incremento de la temperatura que afecta los microclimas en las zonas más altas, 2) cambios en los patrones de precipitación y 3) cambios en los patrones de nubosidad significativos que incrementan la irradiación de sol en los ecosistemas (Pouns *et al.*, 1999). El cambio climático ocasiona la pérdida de biodiversidad, cambio altitudinal de las especies, cambio de rangos de comunidades de especies, y posible muerte del bosque (Foster, 2001; Pouns *et al.*, 1999). Además de cambios abióticos en la temperatura, precipitación y humedad, podrían inducir el

incremento de temporadas secas, inundaciones y tormentas intensas de lluvia, de las cuales podría generar un daño severo a los bosques (Foster, 2001; Pouns *et al.*, 1999).

3.2 EFECTOS DE LOS CAMBIOS POR LA DEGRADACIÓN EN LOS BOSQUES ANDINOS

Los bosques poseen una característica importante que los ayuda a mantener las mismas propiedades funcionales y estructurales después de un cambio o transformación llamada resiliencia. Esta es la capacidad de los bosque de recuperarse tras fenómenos de perturbación importantes y no sufrir degradación con el tiempo (Gunderson, 2000). Esta característica deriva de la biodiversidad en múltiples escalas y comprende desde la diversidad genética hasta la diversidad paisajística (Thompson *et al.*, 2009).

A nivel genético, la resiliencia se expresa a través de la aptitud de las especies en la conservación del pool genético para sobrellevar y desarrollar facultades en una gama de situaciones o variables ambientales. Es decir, la capacidad que tiene una especie para adaptarse a cambios en su ambiente como tolerar distintos valores de temperatura o un cierto grado de humedad, cambios en exposición a radiación solar o nutrientes en el suelo (Tylianakis *et al.*, 2008).

La degradación afecta la resiliencia de los bosques tanto a nivel ecológico como genético (Tylianakis *et al.*, 2008). Sin embargo, los factores ecológicos y genéticos se encuentran interrelacionados ya que al afectarse la demografía de una población (factor ecológico), se afecta la diversidad de la misma y por ende se perturba el flujo génico entre especies alterando la diversidad génica (Gallen *et al.*, 2010). Un estudio en los bosques húmedos

tropicales de Costa Rica examinó los efectos de la fragmentación en la demografía y estado genético de poblaciones de árboles *Symphonia globulifera*. Los resultados revelaron mayores niveles de diversidad genética con valores mayores de endogamia en remanentes de bosque (bosque fragmentado), mientras que en los bosques continuos (no disturbados) de zonas aledañas presentaron una menor diversidad y menor endogamia (Aldrich *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios reflejan diferentes tendencias, por ejemplo, árboles (*Caryocar brasiliense*) en zonas de bosque húmedo fragmentado (Brasil), mostraron valores de diversidad bajos y niveles de endogamia altos en comparación con zonas de bosque no fragmentado, donde los valores de diversidad eran altos y la endogamia era baja (Collevatti *et al.*, 2001).

Uno de los factores antropológicos que afecta la resiliencia es la tala selectiva, ya que altera la biodiversidad y genera degradación en los bosques andinos (Sierra, 2001). La cosecha selectiva reduce la densidad o tamaño poblacional y por ende reduce el intercambio de genes, incrementando la endogamia y elevando las posibilidades de deriva génica (Degen *et al.*, 2006). Especies como *Dicorynia guianensis*, *Sextonia rubra*, *Symphonia globulifera* y *Vouacapoua americana* (Guayana Francesa) que han estado bajo presión de tala selectiva, mostraron valores bajos en heterocigosidad y altos en endogamia (Degen *et al.*, 2006). Otros estudios indican que la tala selectiva de especies como *Swietenia macrophylla* y *Hymenaea courbaril* en la Amazonía Brasileña han generado la pérdida de una alta diversidad alélica y genotípica debido a la cosecha descontrolada y abusiva (Pautasso, 2008). Especies como *Prunus africana* (Kenya), *Eucalyptus consideniana* y *Eucalyptus sieberi* (Australia), *Quercus pyrenaica* (España central), *Castanea sativa* (Europa), *Pinus strobus* (Ontario, Canadá), entre otras poseen una

significativa pérdida de diversidad genética llegando a casi un 75 % de alelos por tala para comercialización y usos energéticos (combustible) (Pautasso, 2008).

La resiliencia de los bosques también depende en gran medida de los organismos polinizadores y dispersores como insectos, mamíferos y aves que mantienen la salud tanto física como genética de las poblaciones de flora y fauna; y, son factores principales para la recuperación, regeneración y salud de los ecosistemas naturales (Thompson *et al.*, 2009; Gunderson, 2000). Diferentes estudios revelan que la deforestación tiene un severo impacto en las micro-especies que componen los suelos (Horgan, 2005; Klein, 1989; Richardson y Richardson, 2010). En bosques fragmentados de la Amazonía central en Brasil existe una menor riqueza de especies de escarabajos que en bosques continuos, ya que el movimiento de los escarabajos era mínimo o casi nulo a través de los claros a otras zonas fragmentadas (Klein, 1989). Debido a la deforestación, existe una reducción poblacional marcada de escarabajos peloteros en los bosques andinos del Perú, donde estos tienen un rol importante, ya que controlan la cantidad de plagas al reducir la materia fecal de los animales, y mantienen la salud de los suelos (ciclo de nutrientes) (Horgan, 2005).

Estudios similares en la selva sur-este de Brasil reportan que el número de especies de mamíferos se encuentra directamente relacionadas al tamaño de área que ocupan, especies como: *Dasyprocta leporina*, *Agouti paca*, *Pecari tajacu* y *Tayassu pecari* se encuentran en menor número de individuos en parches de bosque pequeños (200 ha.) que en áreas más grandes (2000 ha.) (Chiarello, 1999). El mismo patrón es observado en especies de aves como: *Hylophylax poecilinota*, *Micro-bates collaris*, y *Microcerculus bambla*, que son susceptibles al tamaño del habitat, ya que, estas especies necesitan mayor área para su forraje y la fragmentación modifica la estructura o el microclima a nivel del suelo reduciendo la disponibilidad de presas (Stouffer *et al.*, 1995). Sin embargo, algunas

especies de aves se benefician de los claros y los efectos de la fragmentación, especies como: *Automolus ochrolaemus*, *Cercomacra tyrannina*, *Contopus virens*, *Thryothorus coraya* y *Turdus chiguanco*, son más flexibles al tipo de forraje y aprovechan nichos ecológicos abandonados para su provecho (Stouffer *et al.*, 1995).

3.3 LAS PALMAS COMO COMPONENTES IMPORTANTES PARA LOS BOSQUES

Las palmas (Arecaceae) son un componente florístico importante para las interacciones ecológicas de los ecosistemas tropicales (Borchsenius *et al.*, 1998). Las palmas generan materia orgánica, aportando nutrientes esenciales a los suelos (Leblanc *et al.*, 2006), proveen de refugio y alimento a especies de animales involucradas en la dispersión de semillas y polen, atrayendo a gran cantidad de polinizadores como himenópteros y coleópteros y una gran variedad de organismos descomponedores (Leblanc *et al.*, 2006; Henderson, 1995).

Las palmas se componen de alrededor de 200 géneros y 2780 especies con distribución pantropical (Judd *et al.*, 2002). Ecuador es el país con mayor concentración de palmas de Sudamérica (Pintaud *et al.*, 2008). En su territorio existen 32 géneros y 136 especies, mientras que en la región andina existen 15 géneros y 50 especies, lo cual genera un alto endemismo en esta zona y constituye elementos florísticos importantes para los Andes (Borchsenius *et al.*, 1998). Además, a algunas palmas se las considera como indicadores del nivel de alteración en bosques tropicales, debido a que la apertura de claros favorece la colonización de estas (Svenning, 1999). Especies como *Geonoma undata*, *Ceroxylon echinulatum* y *Prestoea acuminata* forman poblaciones densas en los boques andinos,

llegando a ser elementos florísticos claves para el equilibrio del bosque andino (Borchsenius *et al.*, 1998).

Su relación directa con el ser humano esta involucrada desde múltiples aspectos como: medicinal, artesanal, material de construcción, alimentación humana y animal (forraje) (Duran, 1999). Su presencia es fundamental para las interacciones que sostiene con otros organismos como: 1) refugio que proveen a otras especies, 2) la atracción de gran diversidad de polinizadores que se alimentan de las estructuras florísticas, 3) dispersores como mamíferos y aves que dependen de la producción de frutos para su alimentación y 4) la generación de nutrientes para una gran cantidad de insectos y microorganismos descomponedores cuando la palma muere (Borchsenius *et al.*, 1998).

3.3.1 *Prestoea acuminata* (Wild) H. E. como objeto de estudio

El género *Prestoea* pertenece a la tribu Euterpeae, y se encuentra filogenéticamente relacionado a los géneros *Oenocarpus*, *Hyospathe*, *Euterpe* y *Neonicholsonia* (Dransfield *et al.*, 2005; Henderson *et al.*, 1995). Los tallos de este género son de tamaño mediano (de 5 a 15 metros), con un rango de diámetro del tronco de entre 4 a 20 centímetros, cespitoso con pequeños brotes en la base cubiertos con peciolos de hojas viejas. Presentan de 4 a 12 hojas pinnadas, pinnas lanceoladas y sus vainas no forman un filóscapo (*crownshaft*), a excepción de *Prestoea acuminata* que forma un semi-filóscapo. Presenta inflorescencias ramificadas y erectas o arqueadas. Las flores son unisexuales y se encuentran en triadas (una flor femenina y dos masculinas). Los frutos son pequeños de forma circular y oscura (Borchsenius *et al.*, 1998; Henderson *et al.*, 1995). En Ecuador se han reportado cinco especies: *P. acuminata*, *P. carderi*, *P. ensiformis*, *P. pubens* y *P. schultzeana* (Borchsenius *et al.*, 1998).

Prestoea acuminata (Dransfield *et al.*, 2005) se distribuye en las Antillas, Centro América y en los Andes desde los 1000 hasta los 2600 msnm (Borchsenius y Morales, 2006; Van den Eynden *et al.*, 2004). En el Ecuador se ha reportado la variedad *acuminata* (Borchsenius *et al.*, 1998) con distribución en los boques montanos al este y oeste de los Andes desde los 800 hasta los 2600 msnm (Svenning y Balslev, 1998; Van den Eynden *et al.*, 2004; Borchsenius y Morales, 2006).

P. acuminata, conocida como Palmito de Castilla, es una palma de sotobosque que puede medir hasta 15 metros de altura, su tronco puede tener de 4 a 20 centímetros de diámetro, sus hojas presentan una longitud desde 1 a 3 metros, y cada hoja presenta entre 30 a 80 pinas rectas y lanceoladas. *P. acuminata* tiene un hábito mayormente cespitoso (varios clones o troncos forman parte de un solo individuo), sin embargo, también se presentan en forma solitaria (Borchsenius *et al.*, 1998; Gamba-Triminiño *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 1995). Presenta un semi-filóscapo de color morado verdusco, las inflorescencias son horizontales, el pedúnculo floral tiene entre 3 y 20 cm de largo y los frutos de color negro (maduros) tienen entre 1 y 1.2 cm de diámetro, cada inflorescencia puede producir 573 a 2659 frutos maduros (Borchsenius *et al.*, 1998; Gamba-Triminiño *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 1995) (Figura 1).

P. acuminata mantiene múltiples interacciones con los polinizadores, como coleópteros, dípteros e himenópteros (Knudsen, 1995) y dispersores por parte de aves y mamíferos como cotingas (*Rupicola peruvianis*), tucán de montaña (*Andigena laminirostris*), una especie de pava (*Chamaepetes goudotti*), algunos murciélagos y roedores como el ratón de campo (*Oryzomys albigularis*) (Knudson, 1995; Estrada *et al.*, 2007; Klein, 1989),

consecuentemente cambios en el equilibrio del bosque afecta la estructura genética de esta especie (Estrada-Villegas, 2007).

P. acuminata exhibe rasgos ventajosos para una cosecha sostenible entre ellas: 1) es una de las palmas más abundantes en el área estudiada, 2) la extracción del palmito no implica la muerte del individuo, ya que por ser cespitosa posee varios clones para su cosecha 3) la cantidad de tallos apropiados para cosecha es menor al crecimiento poblacional de los clones (Gamba-Triminiño *et al.*, 2011). Sin embargo, existen desventajas en comparación con otras palmas (*Euterpe edulis* y *Bactris gasipaes*) que producen una mayor cantidad de palmito en un menor tiempo. *P. acuminata* toma de 23 a 40 años para su cosecha y de 2 a 3 tallos por individuo maduro. *E. edulis* le toma de 5 a 10 años para su cosecha con una densidad de 500 a 650 individuos cosechables por hectárea y de 2 a 5 años para *B. gasipaes* con 4000 a 7200 individuos cosechables por hectárea (Gamba-Triminiño *et al.*, 2011). Estas características hacen que esta palma no sea tan atractiva para el cultivo masivo, sin embargo para los campesinos de las zonas aledañas a esta palma, representa un ingreso económico y alimenticio útil para su desarrollo.

A pesar de que *P. acuminata* constituye un importante elemento florístico en la dinámica de los bosques montanos, el efecto del disturbio humano en la dinámica genética de las poblaciones no ha sido estudiada. Por ello, analizar el impacto de las actividades humanas en un modelo vegetal como las palmas andinas nos da indicios sobre el efecto antropogénico en la biología de las especies.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

- Analizar el impacto de la degradación de hábitat en la estructura genética de las poblaciones naturales de *Prestoea acuminata*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar el impacto de hábitat (bosque disturbado y bosque no disturbado) en la estructura genética de las poblaciones de *P. acuminata*.
- Analizar la variación temporal de la diversidad genética en tres tipos de cohortes (plántula, juvenil, adulto) de *P. acuminata* por medio de marcadores moleculares (microsatélites).

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 ÁREA DE ESTUDIO

El presente estudio se realizó en la provincia de Pichincha y en el Distrito Metropolitano de Quito. El área de estudio se ubicó en el bosque nublado, con un rango de elevación entre los 1500 a los 2000 msnm, con una temperatura promedio de 18°C a 25°C, y precipitación promedio anual de 1579,9 mm (Cañadas, 1983). La temporada de lluvia puede durar 10 meses con valores de precipitación máxima entre abril y noviembre (Paredes, 2012). La temporada seca comienza entre julio y agosto y dura de dos a tres meses (Ministerio del Ambiente, 2009). En esta región, dos localidades fueron seleccionadas por diferentes niveles de impacto humano: a) reserva Inti Llacta (bosque disturbado, BD), y b) reserva Río Bravo (bosque no disturbado, BnD). Las dos localidades están separadas por *ca.* 20 km (Rodríguez, 2012) (Figura 2).

Inti Llacta, cerca a la localidad de Nanegalito (Distrito Metropolitano de Quito) es una reserva privada (00°02'N, 78°43'W; 1875 ± 16.2 msnm) con 100 ha. de bosque nublado. Esta reserva es un mosaico de parches con diferentes niveles de regeneración y pastizales. Esta localidad presenta un historial de actividades antrópicas que van desde la tala selectiva de palmas y madera, usos de pastizales y zonas de cultivos hasta la creación de la reserva en 1986. Particularmente entre 1970 y 1980, la población natural de *P. acuminata* fue fuertemente cosechada debido a la alta demanda del palmito (Knudsen, 1995; Paredes, 2012). Por estas características, esta área fue seleccionada como modelo de bosque disturbado.

Río Bravo es una reserva privada (00°04'S, 78°44'W; 1690 ± 72.1 msnm) con 4000 ha. de bosque nublado no disturbado (Cantón San Miguel de los Bancos) y es parte de la zona protegida Mindo-Nambillo (19.200 ha.). Debido a la dificultad de acceso, el área ha estado relativamente aislada de las actividades humanas, y por esto se encuentra en buen estado de conservación (Paredes, 2012). Esta reserva fue seleccionada como modelo de bosque no disturbado.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Las poblaciones de *P. acuminata* provenientes de Intillacta (BD) y Río Bravo (BnD) fueron consideradas como dos poblaciones distintas con diferentes estados de conservación. Dentro de cada población fueron identificados tres cohortes o estadios regenerativos: adultos, juveniles y plántulas. Cada cohorte/estado representa diferentes eventos temporales de flujo génico. Por ejemplo, patrones genéticos de los adultos reflejan eventos de flujo génico de hace *ca.* 33-57 años (promedio 45 años, Gamba-Triviño *et al.*, 2011) cuando las condiciones de conservación del bosque fueron mejores que las actuales, mientras que el patrón genético en los juveniles oscila entre 12 a 20 años (promedio 16 años), y para las plántulas reflejan el flujo génico actual (1 a 2 años). Las comparaciones entre cohortes permiten generar inferencias del estado de conservación del bosque (Gamba-Triviño *et al.*, 2011).

Los cohortes o estadíos regenerativos fueron categorizados en: 1) plántulas, individuos con una altura promedio de $12.8 \text{ cm} \pm 2.6 \text{ cm}$ y hojas bífidas, 2) juveniles, individuos en roseta o con tronco visible pequeño, con una altura promedio de $2.9 \text{ m} \pm 0.93 \text{ m}$ y pocos clones (de 2 a 5), 3) adultos, individuos con tronco visible, una altura promedio de $16.8 \text{ m} \pm 5.7 \text{ m}$, (incluyendo la corona), cespitosos, con numerosos clones (>10) y estructuras reproductivas visibles (flores o frutos).

Se recolectó 90 individuos en la reserva privada “Inti Llacta” (BD); 30 plántulas, 30 juveniles y 30 adultos; mientras que, en la reserva Río Bravo (BnD) se recolectó 80 individuos: 30 plántulas, 30 juveniles y 20 adultos, ya que la densidad para esta población era menor y menos accesible (Anexo 1). Una muestra de hoja de cada individuo fue colocado en sílica gel para su secado y preservación.

La distancia promedio de colecta entre los individuos fue aproximadamente de 15 m para las plántulas y los juveniles; y de 20 a 25 m para los adultos. Adicionalmente, se registraron las coordenadas geográficas para obtener un rango de área geográfica de colecta aproximada. El área geográfica aproximada de colecta para la población de Inti Llacta fue de 1.2 km^2 , mientras que para Río Bravo fue de 3.2 km^2 debido a la menor densidad de individuos.

5.2.2 EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE ADN

La extracción del ADN se realizó mediante extracción manual a través del protocolo Doyle & Dolyle (1987) (Reactivos, Anexo 2). Se pesó 50 mg de la muestra foliar, la cual fue macerada en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se añadió 1 ml

de buffer de extracción CTAB 4X (Anexo 2) precalentado a 65°C y 5µl de β-mercaptoetanol. Se mezcló bien hasta obtener un macerado homogéneo. Éste fue transferido a un tubo eppendorf de 2 ml y se incubó por una hora (1h) en baño maría a 65°C. Se realizó un primer lavado con un volumen igual de 1ml de fenol-cloroformo-isoamil (25:24:1). Se homogenizó manualmente durante 10 minutos y se centrifugó por 10 minutos. Se recuperó la fase líquida superior, la cual es transferida a otro tubo eppendorf. El líquido obtenido fue lavado con un volumen igual de cloroformo-isoamil (24:1), luego se agitó hasta que ambos líquidos se mezclaron y se centrifugó por 10 minutos. Se recuperó nuevamente la fase líquida superior, la cual se transfirió a un nuevo tubo eppendorf (este paso se realizó hasta obtener un líquido libre de impurezas). Posteriormente, para precipitar el ADN se colocó 2/3 del volumen de isopropanol frío y se dejó a - 20°C durante toda la noche. Se centrifugó por 10 minutos para la formación de un pellet y se retiró el isopropanol. El pellet se lavó con 1 ml de etanol al 70% por 15 minutos y se retiró el etanol. Se dejó secar el mismo durante 30 - 45 minutos en la estufa a 37°C. Se colocó 50 µl de buffer TE (Anexo 2) para resuspender el ADN. Se añadió 1µl de RNAsa (10mg/ml) y se incubó a 37°C durante 45 minutos.

Una vez obtenidas las soluciones de ADN de cada muestra, se las sometió a lectura mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidas con bromuro de etidio más buffer de carga (azul de bromofenol y cianol xileno), para evidenciar mediante luz UV la concentración y calidad de ADN en la solución (Figura 2). La concentración de ADN se la determinó por la intensidad de fluorescencia de la muestra al compararla con una escalera de concentraciones (Low DNA Mass Ladder de Invitrogen), mientras que la calidad del ADN de la muestra fue hecha de manera visual distinguiendo si había o no degradación y contaminación (proteínas, sales, ARN). Para la amplificación de las muestras se utilizó una

dilución de 1:20 para el ADN por poseer una concentración muy alta, ya que al utilizar el protocolo de extracción manual Doyle & Doyle (1987) se suele obtener una mayor concentración de ADN en las muestras.

5.2.3 AMPLIFICACIÓN DE MARCADORES MICROSATELITES (SSRs)

Para la amplificación de microsatélites (Simple sequences Repeat, SSR), se utilizó primers de *Euterpe edulis* (Gaiotto *et al.*, 2005) y *Oenocarpus bataua* (Montúfar *et al.*, 2006), especies filogenéticamente cercanas a *P. acuminata* (Dransfield *et al.*, 2005). Después de probar estos primers, se utilizaron en *P. acuminata* aquellos que presentaron una amplificación positiva y polimórfica. El protocolo de amplificación de los SSRs seleccionados son descritos en Montufar *et al.*, (2006) y Gaiotto *et al.*, (2005). La reacción en cadena de la polimerasa (PCRs) fue realizada bajo las siguientes concentraciones: volumen total 20- μ L, con un mix dNTPs de 370 μ M, 1 U de *Taq* polimerasa, 1x PCR (Colorless Go-*Taq*, Promega), 2 mM de $MgCl_2$, 0.15 μ m de primer forward-reverse y 5 μ m de solución DNA. La descripción para el Termo-ciclador fue la siguiente: 2 minutos para la denaturación inicial a 96°C, seguido por 35 ciclos a 95°C por 30 s de denaturación, 55, 56, 57 y 58°C temperatura de annealing durante 30s (según SSR), 72°C de elongación por 45 s y una extensión final de 10 minutos a 72°C (Anexo 3).

Una vez obtenidas las amplificaciones, estas fueron probadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 3 % con 3 μ l de la muestra (producto PCR) más 5 μ l de buffer de carga (azul de bromofenol y cianol xileno). Sometiéndolas a exposición de luz UV para comprobar el peso correcto del fragmento (calidad), por medio de una escalera molecular

(100 bp DNA Ladder de Invitrogen) y la concentración del fragmento amplificado se determinó por medio de la intensidad de fluorescencia (Figura 3).

5.2.3.1 Tinción plata

Para la visualización de las amplificaciones y análisis de las diferencias alélicas dentro de la población se realizó la migración de las muestras en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%, mediante electroforesis. Las amplificaciones fueron denaturadas previamente a una temperatura de 95°C por 10 minutos, a través de un agente químico denaturante (Formamida 98%), colocando ambas soluciones (muestra y denaturante químico) en proporciones 1:1. Las muestras denaturadas fueron cargadas en el gel de poliacrilamida en un orden específico y las condiciones de electroforesis del gel fueron de 1500 V, 50 mA, y 100 W por aproximadamente 2 horas (el tiempo varía según el tamaño del fragmento esperado) (Figura 4).

La tinción de geles se realizó mediante la tinción en plata descrita por Benbouza *et al.*, (2006) y Crestel *et al.*, (2001). La metodología para la tinción fue la siguiente: terminada la corrida del gel en la cámara de electroforesis, se separó el vidrio repulsivo del atractivo. Al vidrio atractivo (con el gel) se lo colocó en ácido acético al 10% (solución fijadora) hasta que las marcas de las bandas del marcador de frente desaparecieran (aprox. 30 m). Se retiró el gel de la solución fijadora y se realizó 3 lavados con agua MilliQ por 2 minutos (agitación constante). Luego se sumergió el gel por 45 minutos en la solución de nitrato de plata 1% (solución de coloración) en oscuridad parcial (para un mejor revelado). Después se lavó el gel con agua MilliQ por 20 segundos. Se colocó el gel en la solución de bicarbonato de sodio (solución reveladora), con agitación constante, hasta observar el apareamiento de las bandas; la temperatura de esta solución debe ser de 4 a 10°C. Se

procedió a parar la reacción en una solución de ácido acético al 10% durante 5 minutos y finalmente se lavó el gel con agua MilliQ por tres minutos y se dejó secar (Anexo 2).

5.2.3.2 Lectura de geles y análisis de datos

Los microsatélites polimórficos amplificados fueron leídos midiendo la distancia recorrida desde el frente de migración (lugar donde se cargan las muestras) con la ayuda de una regla y la información transferida a matrices basadas en la presencia o ausencia de los alelos. El tamaño de cada alelo fue determinado mediante la correlación de la posición del alelo con respecto a una escalera específica, la cual permite reconocer diferencias en intervalos de 10 bp (30-330 bp AFLP DNA Ladder de Invitrogen). Se realizó un gráfico de dispersión entre la distancia migrada por cada banda de la escalera y su correspondiente peso molecular; y, se obtuvo la ecuación de la recta ($a = mX + b$) reemplazando la distancia migrada de cada alelo en "X".

Con los datos obtenidos se realizó una matriz en Excel utilizando los programas estadísticos de computadora GenAlex 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), GenePop 1.2 (Raymond y Rousset, 1995), Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005) y Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1999).

5.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

5.2.4.1 Desequilibrio ligado

El desequilibrio ligado (Linkage disequilibrium) se lo emplea para determinar si los microsatélites o loci usados se encuentra asociados independientemente entre sí (distribución al azar) o no (Freeland, 2005). Esta prueba refleja las diferencias entre las frecuencias esperadas de un locus bajo la suposición de independencia, y la frecuencia observada del locus. Un valor de 0 indica que el loci examinado es independiente del otro, mientras que un valor de 1 demuestra completa dependencia (Freeland, 2005).

5.2.4.2 Diversidad Genética

A través del programa Arlequín (Excoffier *et al.*, 2005) y GenAlex (Peakall y Smous, 2012), se calculó la diversidad alélica (A_o), la riqueza alélica (R_s) y la heterocigosidad esperada. Una de las formas para calcular la diversidad genética en las poblaciones es a través de la diversidad alélica que es el número promedio de alelos por locus (Freeland, 2005). Este método es sensible al tamaño de muestra y variará de acuerdo al número de individuos muestreados (Freeland, 2005).

La heterocigosidad esperada (H_e) o diversidad génica que es la probabilidad de que dos alelos al azar sean diferentes dentro de la muestra (Nei, 1973). Este método es menos sensible al tamaño de la muestra (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005) y se la calcula de la siguiente manera:

$$h = 1 - \sum_{i=1}^m x_i^2$$

Donde X_i es la frecuencia del alelo i y m es el número de alelos que han sido encontrados en un locus determinado (Freeland, 2005).

También, se calculó la heterocigocidad observada (H_o), que es el número de heterocigotos observados dividido para el número total de individuos muestreados (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005).

Se compararon las medias de los valores obtenidos para la diversidad génica a través de un Test de Wilcoxon, para determinar si existían diferencias significativas entre ellas. Se utilizó el programa SPSS Statistics 18 (I.B.M, 2009).

5.2.4.3 Análisis estructurales y diferenciación genética

A través de los programas Fstat (Goudet, 1995) y GenAlex (Peakall y Smous, 2012) se calcularon los estadísticos F (Wright, 1951). Para este estudio, se utilizaron dos parámetros: 1) el coeficiente de endogamia (F_{is}), que describe el nivel de endogamia de un grupo o población y 2) el índice de fijación (F_{st}), que describe la diferenciación entre grupos por fijación de alelos (Beebee y Rowe, 2008).

El coeficiente de endogamia (F_{is}) es la probabilidad de que un individuo tenga un par de alelos que sean idénticos por descendencia de un ancestro común, es decir, refleja la probabilidad de que un individuo en un locus particular sea homocigoto o que exista desbalance entre las proporciones esperadas entre homocigotos y heterocigotos como describe el equilibrio Hardy – Weinberg (HWE) (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005).

El valor obtenido oscila entre -1 y 1, siendo 0 el equilibrio entre las proporciones de

heterocigotos y homocigotos, o se encuentran en equilibrio Hardy – Weinberg. Un valor mayor a 0 indica endogamia o un mayor estado de homocigosis, mientras que un valor negativo o menor a 0 indica que existe una mayor proporción de heterocigotos versus homocigotos en el grupo (Beebee y Rowe, 2008; Freeland, 2005). Los valores se obtienen mediante la siguiente fórmula:

$$F_{is} = (H_e - H_o) / H_e$$

Donde H_e determina los heterocigotos esperados bajo el supuesto HWE y H_o determina los homocigotos observados dentro del grupo analizado. Se compararon las medias de los valores obtenidos para el coeficiente de endogamia (F_{is}) por medio del test de Wilcoxon a través del programa SPSS 18 (I.B.M., 2009). Sin embargo, el set de datos obtenidos por medio de los SSRs de cada cohorte refleja una amplia variación de las medias para este valor (F_{is}), por ende la desviación estándar proporcionara un valor más cercano al que existe entre las poblaciones.

El índice de fijación (F_{st}) es otro estadístico desarrollado por Wright, para calcular la diferenciación genética entre poblaciones, y establece la reducción de la heterocigosidad dentro de una subpoblación de una población total debido a selección o deriva génica (Freeland, 2005). Se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$F_{st} = (H_t - H_e) / H_t$$

Donde H_e son los heterocigotos esperados dentro de una subpoblación particular y H_t son los heterocigotos esperados de la población total (Freeland, 2005).

La distancia genética de Nei (1972) se utiliza para calcular la similaridad genética entre grupos y calcular su distancia genética. Estima el número de poblaciones que a nivel nucleotídico se han acumulado en las secuencias de dos linajes a partir del tiempo que ha transcurrido desde su divergencia original, es decir que los diferentes loci son originados gracias a que una base nucleotídica está presente o ausente. Por lo tanto, es posible calcular estadísticamente el número promedio de diferencias en las bases nucleotídicas (Freeland, 2005). Los valores son calculados por la siguiente ecuación:

$$I = \sum_{i=1}^m (P_{ix}P_{iy}) / \left[\left(\sum_{i=1}^m P_{ix}^2 \right) \left(\sum_{i=1}^m P_{iy}^2 \right) \right]^{0.5}$$

Donde P_{ix} es la frecuencia de un alelo i en la población x , P_{iy} es la frecuencia de un alelo i en la población y , y m es el número de alelos en un locus; mostrando valores entre 0 y 1.

Una vez obtenido el valor I se lo reemplaza en la ecuación de la distancia genética de Nei (D):

$$D = \ln I$$

Los valores obtenidos tendrán un rango de 0 al infinito. Cuando dos poblaciones poseen frecuencias alélicas similares la similaridad genética (I) se aproximará a 1, mientras que, la distancia genética (D) se aproximará a 0, cuando las dos poblaciones no son similares (I) se acercará a 0 y (D) al infinito (Freeland, 2005).

Se calculó el número de migrantes (Nm) por población y sus diferentes estadíos. Con la siguiente fórmula:

$$Nm = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$$

Cuando el Nm sea alto el valor de diferenciación será mayor. La migración es una fuerza muy potente que actúa en contra de la divergencia genética entre poblaciones, la cual se genera como consecuencia de la deriva génica por azar. Si el valor de Nm es muy bajo

predomina el efecto de la deriva y la mayoría de las poblaciones estarán fijadas. Si el valor de Nm es grande la deriva génica será poco importante y contrarrestada por la migración; por tanto, las subpoblaciones tenderán a mantener las mismas frecuencias génicas.

Con el objetivo de visualizar los patrones genéticos entre cohortes/estadios y entre localidades se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) utilizando los valores de la distancia genética de Nei (1972) y los valores F_{st} (Wright, 1951).

Se realizó un análisis de cuello de botella (bottleneck) para determinar si las poblaciones analizadas sufrieron una reducción drástica en su diversidad alélica. Se utilizó el programa Bottleneck 1.2.02. (Cornuet y Luikart, 1999), el cual detecta efectos recientes en la reducción del tamaño de una población por medio de las frecuencias alélicas encontradas en cada población. La cantidad de alelos raros y frecuentes son utilizados en diferentes modelos estadísticos para determinar una reducción en la diversidad de una población. El análisis se realizó bajo el Modelo de Dos Fases (T.P.M), ya que este modelo se ajusta de mejor manera a los datos proporcionados (frecuencias alélicas) de los microsatélites (McEachern *et al.*, 2011).

6. RESULTADOS

6.1 OBTENCIÓN DE ADN

La extracción de ADN por medio del protocolo Doyle & Doyle (1987) fue exitosa, las concentraciones obtenidas variaron entre 50 y 200 ng/ μ l. Algunas muestras presentaron rastros de metabolitos secundarios, por lo cual fue necesario un segundo lavado para su purificación. De igual forma, algunas muestras presentaron un leve grado de degradación; sin embargo, esto no afectó la amplificación de los microsatélites, ya que estas son regiones cortas dentro del genoma, difícilmente afectadas por la degradación.

6.2 FASE MOLECULAR

6.2.1 Amplificación

Para los microsatélites con problemas de lectura, se volvió a correr y teñir con el fin de corroborar los datos dudosos. Se utilizó un total de nueve microsatélites bajo los protocolos descritos en Montufar *et al.*, (2006) y Lepsh-Cunha *et al.*, (2003), de los cuales seis fueron polimórficos y tres monomórficos (Tabla 1). Los seis microsatélites seleccionados mostraron un 100% de polimorfismo. El número promedio de alelos por locus (microsatélite) para todas las poblaciones (n=170) fue alrededor de 9, el locus AG5-5#1 mostró el menor número de alelos (3), mientras que el locus Ob22 presentó 21 alelos.

6.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

6.3.1 Desequilibrio ligado y equilibrio Hardy-Weinberg

Los análisis de desequilibrio ligado (linkage disequilibrium), bajo una significancia de 0.05 y 0.01, mostraron 4 pares de loci significativamente ligados de las 15 posibles combinaciones (pares de loci), tanto para el bosque disturbado (n=90), como para el bosque no disturbado (n=80) (Tabla 2). También se reportaron algunos pares de loci ligados por estadíos para cada población. En la población de BD se observó 4 loci ligados para el estadio de juveniles (n=30), 1 para las plántulas (n=30) y 2 para los adultos (n=30); mientras que para la población de BnD se encontró un loci ligado para el estadio de juveniles (n=30), 2 para plántulas (n=30) y 1 para el estadio adulto (n=20, Tabla 3). El microsatelite AG5-5#1 presentó dos alelos que tenían la frecuencia alélica más alta entre todas las poblaciones, mientras que los demás microsatélites presentaron valores similares entre ellos (Figura 5 y 6).

Se reportan desviaciones significativas ($P > 0,001$) del equilibrio Hardy-Weinberg para las dos poblaciones (n=170) con los que se comprueba que ninguna de las poblaciones (BD y BnD) se encuentra bajo equilibrio.

6.3.2 Análisis de la diversidad genética entre poblaciones: bosque disturbado (BD) vs bosque no disturbado (BnD)

A pesar de que son localidades relativamente próximas, con menos de 20 km de distancia, se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la diversidad alélica (A_o), riqueza alélica (R_s), alelos únicos y heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e). En base al número de alelos absolutos (A_o) entre las poblaciones estudiadas, BD ($n=90$) presentó 61 alelos, mientras que en el BnD ($n=80$) se observó 46 alelos en total (Tabla 4). El número de alelos privados fue mayor para el BD con un total de 11 alelos, mientras que para la población de BnD fue de un alelo (Tabla 5).

Para la riqueza alélica (R_s) se describió el mismo patrón, en donde el BD presentó un mayor número promedio de alelos que la población de BnD, un total de 10.54 en promedio vs 7.66, respectivamente (Tabla 6).

Con respecto a la diversidad génica, la población del BD presentó un valor mayor de heterocigosidad esperada (H_e) de 0,77 y heterocigosidad observada (H_o) de 0,52. Mientras que para la población de BnD, los valores obtenidos para la heterocigosidad esperada (H_e) y observada (H_o) fueron 0,65 y 0,61 respectivamente. El H_e y el H_o difirieron significativamente ($p < 0.05$) entre los tipos de bosque (BD y BnD) (Tabla 6).

Para los valores de F_{is} , la población de bosque disturbado presentó la cifra más alta con 0,181, mientras que la población de bosque no disturbado presentó un valor de -0,02. El valor de F_{is} varió significativamente ($p < 0.05$) entre los dos tipos de bosque (Tabla 6).

Los análisis de las frecuencias alélicas no reflejan tendencia en pérdida de alelos en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, bajo el modelo probabilístico Two-Phases Model (T.P.M.) sugiere un posible cuello de botella en los juveniles del BnD con un valor de 0.007 ($p < 0.01$). Se asume teóricamente que poblaciones con disminución en el número de alelos con baja frecuencia (alelos raros) podría constituir un indicador de cuello de botella (Tabla 7). El número promedio de migrantes (N_m) entre las dos poblaciones (bosque disturbado y bosque no disturbado) fue 10.46.

6.3.3 Estructura genética entre cohortes para las dos poblaciones (BD y BnD)

Los análisis de diversidad y estructura genética para el bosque disturbado (BD) no existen diferencias significativas ($p > 0,05$) de alelos absolutos (A_o) entre cohortes ($n=3$) (Tabla 8). Estos patrones coinciden con los reportados por el número efectivo de alelos (Tabla 9). Para la riqueza alélica (R_s) del BD, las plántulas mostraron valores mayores (7.16) (Tabla 10). Esta población mostró 11 alelos únicos, cuatro de estos fueron reportados en adultos, dos en juveniles y cinco en plántulas (Tabla 5).

El cohorte con mayor heterocigosidad en el BD corresponde a las plántulas (0,56/0,69), la menor heterocigosidad (H_o/H_e) fue reportado para juveniles (0,48/0,63). Los valores de heterocigosidad entre cohortes no fueron diferentes significativamente ($p > 0.05$) (Tabla 10).

Para los valores de F_{is} reportados del BD, los juveniles obtuvieron las mayores cifras (0,22), mientras que el menor valor reportado fue para las plántulas (0,15) (Tabla 10). Los valores de F_{is} entre cohortes no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

En los análisis de diferenciación (F_{st}) se observó muy poca diferenciación entre los estadíos y el mismo resultado se corroboró con la distancia genética de Nei (1972), sin embargo, las plántulas de BnD mostraron más similaridad genética con los juveniles de BD (Figuras 7 y 8).

En los análisis estadísticos para el bosque no disturbado (BnD), existe un incremento de alelos para las plántulas ($A_o=43$) en comparación con juveniles y adultos (Tabla 8). Las plántulas mostraron una mayor riqueza alélica ($R_s=7,17$), mientras que los adultos obtuvieron el menor valor (Tabla 10). Para esta población, el único alelo privado fue identificado en plántulas (Tabla 5). No existen diferencias estadísticamente significativas entre cohortes ($p>0,05$) para estos valores.

Los valores de heterocigosidad H_o/H_e se reportan en la Tabla 10. Las plántulas del BnD obtuvieron los mayores valores de heterocigosidad (0,64/0,63), mientras que la menor heterocigosidad fue en adultos (0,49/0,55). Los valores de heterocigosidad entre cohortes no fueron diferentes significativamente ($p>0.05$) (Tabla 10).

Para los valores reportados de F_{is} en el BnD, los adultos obtuvieron las mayores cifras (0,05), mientras que las plántulas mostraron el menor valor (-0,03). Los valores entre cohortes no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) (Tabla 10).

La diferenciación genética (F_{st}) fue más marcada en los adultos en esta población (Tabla 12). Lo cual coincide con los valores de la distancia genética de Nei (1972). Existe una mayor similaridad genética entre las plántulas y los juveniles de esta población (Figura 7).

7. DISCUSIÓN

7.1 EFECTO DEL ESTADO DE CONSERVACIÓN DEL BOSQUE EN LA DIVERSIDAD GENÉTICA

Los resultados obtenidos dan evidencia del efecto antropogénico sobre el estado del bosque en la estructura genética de las poblaciones. El bosque disturbado (BD) tuvo una mayor diversidad alélica, mientras que en el bosque no disturbado (BnD) la diversidad alélica fue menor. Teóricamente, se esperaría que el BnD, por estar en buen estado de conservación, albergue mayor diversidad genética (Obayashi *et al.*, 2002), sin embargo este no fue el caso. La mayor diversidad reportada en el BD podría estar asociada a varios factores:

1) efecto del muestreo, el muestreo de esta zona no fue representativo para esta población, por lo tanto no refleja la estructura genética o diversidad real. Si se ampliara el área de colecta se podría tener una mejor muestra y valores más cercanos al universo muestral o incrementar el número de marcadores de microsatélites utilizados (Freeland, 2005). Estudios similares en bosques disturbados y no disturbados implementan un área de colecta de *ca.* 600 m² por cada población analizada (Mimura *et al.*, 2009), mientras que otros estudios en las mismas condiciones reportan áreas de colecta para bosques continuos de *ca.* 4.2 km² para bosques continuos y 42 km² para bosques fragmentados (Collevatti *et al.*, 2001). El área de colecta podría reflejar valores que no representen la especie de *P. acuminata* en ambas poblaciones, un mayor rango de colecta o el uso de diferentes subpoblaciones aledañas proporcionaría valores más reales para cada población.

2) Influencia de la posición geográfica de las poblaciones. La ubicación juega un papel importante en la estructura y distribución de la diversidad genética (Larrea *et al.*, 2011). Poblaciones centrales espacialmente tienden a albergar más diversidad que poblaciones en

las periferias (Larrea *et al.*, 2011). La población de *P. acuminata* de Nanegalito tiene una posición geográficamente central, rodeada de otras poblaciones (Nanegal, Pacto, Gualea) que potencialmente alimentan el flujo génico hacia esta población. Mientras que, la población de Río Bravo se encuentra en una posición geográfica y ecológica (límite del bosque nublado) marginal dentro de su área de distribución, limitando las posibilidades de flujo génico con otras poblaciones. Un similar patrón al de *P. acuminata* fue reportado para la palma de ramos (*Ceroxylon echinulatum*) en las mismas áreas de estudio, en donde, los resultados relacionados a la diversidad genética muestran que *C. echinulatum* tienen más diversidad genética en el BD que en el BnD, esto sugiere que existen patrones geográficos que influyen en la estructura genética en las poblaciones de Nanegalito (Espinoza, 2010).

El bosque disturbado presentó los valores más altos de endogamia, que el bosque no disturbado. Los altos valores de F_{is} concuerdan con la presencia de linkage disequilibrium en varios pares de loci en las poblaciones evaluadas. Estos valores de endogamia se podrían explicar a través de varias hipótesis:

- 1) El disturbio humano y su impacto en los mecanismos de flujo génico. Evidentemente, este escenario es viable, ya que en el noroccidente de Pichincha junto a otros ecosistemas han sido gradualmente degradados durante las últimas décadas (Rhoades, 2001), especialmente la zona de BD (Nanegalito) que por su ubicación y condiciones geográficas (fácil acceso, características climáticas, calidad de tierras) ha sido intervenida por actividades antropogénicas (tala, ganadería, agricultura) desde inicios del siglo XX (Knudsen, 1995; Rhoades, 2001); mientras que, Río Bravo ha conservado su dinámica natural e interacciones ecológicas, ya que es una zona relativamente aislada de actividades humanas, por lo que mantiene procesos importantes como polinización, predación y

dispersión que ayudan a mantener un balance poblacional estable (Paredes, 2012). Estudios sobre fragmentación en la especie *Eucalyptus globulus* reportan un patrón similar de endogamia; en estas, se encontró un mayor grado de endogamia en el bosque disturbado, debido a la reproducción entre individuos emparentados, en cambio para el bosque no disturbado los valores de endogamia fueron mucho menores (Mimura *et al.*, 2009). Para la especie *Shorea curtisii*, árboles longevos que habitan en las selvas de Tailandia, Malasia e Indonesia se encontraron patrones similares de endogamia en bosque disturbados y bosques no disturbados (Obayashi *et al.*, 2002). Sin embargo, estudios similares reportan patrones diferentes de valores endogámicos entre bosques disturbados y no disturbados en comparación con los obtenidos en este estudio. Según Aldrich, (1998) las poblaciones de árboles tropicales (*Symphonia globulifera*) muestran similaridad en valores de endogamia en BD vs BnD.

2) Falta de independencia entre las muestras colectadas, ya que el área de colecta fue relativamente pequeña en comparación con el área total de la reserva de BD, la distancia entre individuos fue cercana entre ellos (*ca.* 15m) y esto podría reflejar valores de endogamia que no representen a la población total. Sin embargo, estudios similares de áreas fragmentadas reportan niveles altos de endogamia, en donde los individuos colectados se encontraban a una distancia *ca.* de 6 a 7 m (Cardoso *et al.*, 2005; Nason y Hamrick, 1997; Mimura *et al.*, 2009). Esto sugiere que la distancia entre los individuos colectados no influye en los datos obtenidos. Sin embargo, la conectividad que existe entre las poblaciones florísticas depende de una dinámica saludable de polinizadores y dispersores en los ecosistemas. Consecuentemente, la endogamia podría ser explicada a través del flujo génico inadecuado entre los individuos. Por esta razón, las especies de una población solo pueden reproducirse entre individuos espacialmente cercanos, los cuales

tienen mayor probabilidad de ser emparentados incrementando la endogamia (Mimura *et al.*, 2009).

Según los resultados obtenidos de la diferenciación genética (F_{st}) se observa que las 2 poblaciones (BD y BnD) son genéticamente similares ($F_{st} = 0,072$). Esta similaridad genética está relacionada a la corta distancia entre las poblaciones (20 km.). Sin embargo, a distancias similares reportadas en este estudio, algunas poblaciones exhiben una mayor diferenciación genética debido al nivel de degradación de ecosistema (Aguirre y Dirzo, 2008; Cardoso *et al.*, 2005). Poblaciones de *Caesalpinia echinata* en bosques fragmentados en las costas de Brasil a una distancia de 20 km mostraron valores de F_{st} de 0,12 (Cardoso *et al.*, 2005). A pesar de que estas poblaciones de *P. acuminata* se encuentran separadas por ca. 20 km, mantienen mecanismos que les permiten la conectividad de alelos y un flujo genético estable.

El número de migrantes encontrados entre las dos poblaciones estudiadas (BD y BnD) ($N_m=10,46$) podría reflejar la similaridad genética que existe entre ellas (Norman *et al.*, 1993). Estudios similares en un bosque disturbado de árboles monoicos, *Ficus* (Moraceae), reportan un número de migrantes $N_m=5.13$ para poblaciones con 3 km de distancia (Nason y Hamrick, 1997) y en plantas acuáticas *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae), reportan un $N_m=20$ para poblaciones con 40 km de distancia entre ellas (Husband y Barrett, 1994). Se asume que entre las dos poblaciones estudiadas (BD y BnD) existe un alto flujo de migrantes reafirmando la similaridad genética que concurre entre ellas.

Según los análisis realizados no se pudo detectar la presencia de cuello de botella. El número de alelos con frecuencias bajas (<0.05) fueron superiores al número de alelos con

frecuencias altas (>0.05). Se sugiere que la disminución en el número de alelos con frecuencias bajas (raras) podría ser un indicio de un cuello de botella. Entre los dos tipos de bosques no se detectó una reducción de alelos raros.

7.2 DINÁMICA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL BOSQUE DISTURBADO

Los resultados obtenidos de la diversidad genética (A_o , R_s y H_e) entre cohortes revelan que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) en el BD. Sin embargo, existe pequeñas diferencias entre estos valores. Los juveniles muestran el nivel más bajo de diversidad en comparación a los otros cohortes (plántula y adulto). Posiblemente los valores de diversidad encontrados reflejan historias de cosechas anteriores que pudieron afectar a los cohortes. Los efectos de la tala utilizadas en esta población pudo afectar la polinización y dispersión, consecuentemente la tala pudo modificar estas dinámicas entre los diferentes cohortes a través del tiempo. La demografía de *P. acuminata* (localmente densa) podría explicar parcialmente la alteración en el proceso de dispersión de semillas. Estudios realizados por Paredes *et al.*, (2012) muestran que en una hectárea de BD existen más de 29 individuos adultos de *P. acuminata* y esto comparado con la demografía de esta misma especie en el BnD (9 individuos por hectárea) representa una gran densidad de individuos. Igualmente, la cantidad de plántulas por hectárea para el BD era mayor en comparación con el BnD (*ca.* >110 para BD y >30 para el BnD; observación personal). Al no existir dispersores óptimos los individuos de una especie tienden a aglomerarse dando evidencia de alteraciones del bosque. Sin embargo, un disturbio además de afectar los diferentes mecanismos de dispersión y polinización, también podrían favorecerlo ya que

ciertas especies que se benefician de zonas alteradas incrementando el nivel de dispersión y polinización (Basset *et al.*, 1998; Cardoso *et al.*, 2005; Stouffer *et al.*, 1995).

En los análisis de endogamia en el BD se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativa entre los cohortes. Sin embargo, los valores de endogamia fueron mayores en cohortes de adultos y juveniles ($F_{is}=0,217$ y $0,225$ respectivamente), mientras que el menor fue para las plántulas con $F_{is} = 0,155$. Para el caso de las plántulas, la menor endogamia podrían estar relacionadas a la facilidad en la dinámica de algunos dispersores y polinizadores (aves o algunos dípteros) no propios del ecosistema, en el que, en un bosque disturbado, tienen mayor posibilidad de espacio de forrajeo incrementando el rango de dispersión de las semillas y posible apareamiento entre individuos lejanos (polinización) posiblemente esto podrían estar favoreciendo una tendencia a la reducción de endogamia en las plántulas (Basset *et al.*, 1998, Stouffer *et al.*, 1995). Para este caso los polinizadores como coleópteros pudieran no intervenir directamente en el flujo genético, ya que por las condiciones climáticas adversas de los claros entre los bosques fraccionados se dificulta el desplazamiento de estos entre parches (Horgan, 2005; Klein, 1989). También, el viento podría ser un factor en la dispersión del polen, ya que en bosques fraccionados existe mayor flujo del viento por la existencia de claros que permiten un intercambio genético constante entre las poblaciones (Sezen *et al.*, 2005).

Entre las cohortes estudiadas no se detectó una reducción de alelos raros. Por lo tanto, no hay indicio de cuello de botella entre cohortes en esta población.

7.3 DINÁMICA EN LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN EL BOSQUE NO DISTURBADO

Los resultados obtenidos de la diversidad genética (A_o , R_s y H_e) entre cohortes revelan que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) en el BnD. Siendo este ecosistema un bosque no disturbado, se infiere que existen óptimos mecanismos de polinización, dispersión y reclutamiento, en donde las interacciones ecológicas entre planta, polinizador y dispersor son estables; y las condiciones ambientales son favorables para el reclutamiento de los nuevos individuos (Anthelme *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2012). Las especies de invertebrados que polinizan a *P. schultzeana* como: Coleóptera, Hemíptera, Díptera, Lepidóptera, e Hymenoptera han sido catalogados como especies sensibles a cambios estructurales en los ecosistemas y distancias entre bosques fragmentados (Grez *et al.*, 2008; Favero *et al.*, 2011; Ouin *et al.*, 2006). Por ser un ecosistema no disturbado, los factores ambientales como temperatura, humedad y las características del suelo son relativamente estables o se encuentran en un umbral ecológico natural, en donde, las poblaciones de las especies mencionadas se encuentren equilibradas y los diferentes dispersores activos (Anthelme *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2012; Thompson, 2011). Esto podría favorecer el flujo génico de las poblaciones incrementando con el tiempo la resiliencia genética.

En los análisis de endogamia en el BnD se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativa entre los cohortes. Sin embargo, se observa una ligera tendencia de reducción entre los cohortes para la endogamia (Tabla 10). Este patrón podría estar relacionado mejoría progresiva de los diferentes polinizadores y dispersores del ecosistema. El patrón de distribución de densidad (alrededor de 9 adultos por hectárea)

que presenta *P. acuminata* para esta población, va de acuerdo con un patrón esperado en un bosque no disturbado, en donde, los individuos se encuentran separados uniformemente o más alejados unos de otros. Esto podría indicar una óptima dinámica de los polinizadores y dispersores (frugívoros y descomponedores) para esta especie, evitando el apareamiento entre individuos relacionados y reduciendo los niveles de endogamia en esta población. (Anthelme *et al.*, 2011; Paredes *et al.*, 2012).

En los análisis de diferenciación genética (F_{st}) se observó que las plántulas están más diferenciados genéticamente a los adultos que a los juveniles. Igualmente, la distancia genética de Nei, muestra que existe una mayor similaridad genética entre plántulas y juveniles que entre plántulas y adultos. Esto podría deberse a que existió un aumento en la migración en el pasado entre poblaciones (de Nanegalito a Río Bravo) generando diferentes escenarios de flujo génico. Esta hipótesis se corrobora mediante el análisis global entre poblaciones, en las cuales se ve una fuerte similaridad entre los estadios juveniles de Nanegalito y plántulas, juveniles de Río Bravo (Figura 7). Con un valor aproximado Nm de 2,3 juveniles del BD hacia plántulas del BnD (Tabla 10).

Para el análisis de cuello de botella no se observa un patrón que indique una reducción inicial o pérdida de alelos diferentes en esta población. Sin embargo, bajo el modelo propuesto por Bottleneck (Two-phases Model) se obtuvo diferencias significativas ($p < 0.01$) para el estadio juvenil (Tabla 12). Esto podría deberse a que gracias al flujo de nuevos individuos provenientes de otras poblaciones (Nanegalito y poblaciones circundantes) hubo una introducción de nuevos alelos, incrementando así la diversidad genética para las plántulas; y, ratificando la similaridad presentada en los análisis de distancia genética de Nei (Figura 7).

8. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONSERVACION Y MANEJO DE BOSQUES

La resiliencia o la capacidad de una población para recuperarse de eventos de perturbación importantes dependen en gran medida de las estrategias que tienen las especies para adaptarse a condiciones adversas. *Prestoea acuminata* es una especie que posee mayor resiliencia o mayores estrategias ecológicas que son mucho más eficaces que otras especies, y que le permiten adaptarse a disturbios que alteran el hábitat natural. Sin embargo, otras especies de palmas poseen limitación que las hace más sensibles a los cambios ambientales, reduciendo su diversidad genética e incrementando la endogamia. Por lo tanto, estas poblaciones tendrán menor resiliencia a futuro desembocando en deriva génica y finalmente a su posible extinción. La importancia del manejo de la diversidad genética en las poblaciones de palmas da indicios, no solo del estado de la población estudiada, sino del estado de los sistemas de polinizadores y dispersores y la demografía de la especie.

El efecto de la degradación sobre los bosques perturba la dinámica en interacciones planta-animal, en donde existe una continua pérdida de diversidad genética que es necesario conservar. En la población estudiada de Nanegalito, se observó una menor densidad y diversidad de fauna (observación personal) en comparación a la población de Río Bravo. Para el bosque no disturbado se observó mayor densidad y diversidad de fauna y se asume que existen dispersores óptimos que regulan la densidad y demografía para *P. acuminata* (Lal, 1986). En los bosques no disturbados la diversidad genética se mantiene constante, a

pesar de que puede tener menor diversidad como población. También, las tasas de endogamia se mantienen relativamente reducidas lo que sugiere que existen diferentes mecanismos que contribuyen al incremento de la diversidad genética.

El efecto de la degradación perturba la dinámica de los bosques. Este efecto limita a polinizadores y dispersores y consecuentemente reduce el flujo génico entre especies (Anthelme *et al.*, 2011). Existen dispersores claves en *P. acuminata* que son fundamentales para regular la densidad y la distribución espacial de las semillas, sin estos dispersores la diversidad genética decrece y el equilibrio genético cambia. Adicionalmente, sin estos dispersores, existe un efecto en la demografía de las poblaciones, ya que se generan cambios en el patrón de distribución y existe una mayor aglomeración entre ellos (Knudson, 1995; Estrada *et al.*, 2007; Klein, 1989).

Los bosques secundarios, que son el resultado de la degradación del bosque primario, pueden ser manejados para producir madera y otros bienes (agrícolas, ganaderos, etc.), y de esta manera, reducir la presión sobre los bosques naturales. Estos bosques, generalmente son más accesibles desde los centros de población, que de las áreas remotas del bosque natural; y pueden ser tan productivos como las plantaciones, sin que exista la necesidad de hacer una inversión inicial. Se debe analizar el manejo de los bosques secundarios como una alternativa de uso para impedir la explotación de las áreas que todavía no han sido tocadas (Lamprecht, 1989). Si existe un mal manejo de los bosques primarios o se desbrozan con el fin de convertirlos a otros usos, como la agricultura, o ganadería, se puede degradar el bosque y producir el crecimiento secundario, matorrales o tierras baldías. El mal manejo del bosque puede aumentar la erosión y sedimentación de los recursos acuáticos, interrumpir la hidrología, causar mayor inundación, escasez de agua

y degradación de los ecosistemas acuáticos, reducir los recursos genéticos e intensifican los problemas socioeconómicos (Lamprecht, 1989). Es necesario tener un control en las cosechas de palmitos en los bosques secundarios, para evitar el desbalance genético (incremento de endogamia) que podría llevar a reducir la resiliencia en estas poblaciones.

Es importante implementar programas para utilizar las bases genéticas que existen de especies en buen estado genético en los bosque no disturbados como fuente de alelos para programas de reforestación y también promover el manejo del germoplasma de *P. acuminata* en bancos de germoplasma para futuras investigaciones.

*La naturaleza está constituida
de tal manera que es
experimentalmente imposible
determinar sus movimientos absolutos.*

Albert Einstein

9. LITERATURA CITADA

- Aguirre, A. y Dirzo, R. 2008. Effects of fragmentation on pollinator abundance and fruit set of an abundant understory palm in a Mexican tropical forest. *Biological conservation* 141: 375-384.
- Aldrich, R. P., Hamrick, L. J., Chavarriaga, P. y Kochert G. 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7: 933-944.
- Altamirano, A., Echeverria, C., y Lara, A. 2007. Efecto de la fragmentación forestal sobre la estructura vegetacional de las poblaciones amenazadas de *legrandia concinna* (Myrtaceae) del centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 80: 27- 42.
- Anderson, E. P., Marengo, J., Villalba, R., Halloy, S., Young, B., Cordero, D., Gast, F., Jaimes, E., y Ruiz D. 2013. Consequences of Climate Change for Ecosystems and Ecosystem Services in the Tropical Andes. . Inter-American Institute for Global Change Research. *Climate Change and Biodiversity in the Tropical Andes*. Chapter #1.
- Anthelme, F., Lincango J., Gully, C. Duarte N. y Montúfar R. 2011. How anthropogenic disturbances affect the resilience of a keystone palm tree in the threatened Andean cloud forest? *Biological Conservation* 144: 1059–1067.
- Ataroff, M. & Rada, F. 2000. Deforestation impact on water dynamics in a Venezuelan Andean cloud forest. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 29 (7): 440-444.
- Bacles, C.F.E., Lowe, A. J. y Ennos, R.A. 2004. Genetic effects of chronic habitat fragmentation on tree species: the case of *Sorbus aucuparia* in a deforested Scottish landscape. *Molecular Ecology* 13: 573–584.

- Bargo, F. 2008. Consumo en materia seca en vacas en pastoreo. Conferencia en el 31°. Congreso Argentino de producción Animal. Buenos Aires, Argentina.
- Basset, Y., Novotny, V., Miller, S. y Springate, N. 1998 Assessing the impact of forest disturbance on tropical invertebrates: some comments. *Journal of Applied Ecology* 35: 461-466.
- Baz, A. & Boyero, G. 1995. The effect of forest fragmentation on butterfly communities in central Spain. *Journal of Biogeography* 22: 129-140.
- Beebee, T. y Rowe, G. 2008. *An Introduction to Molecular Ecology*, Second Edition. Oxford University Press. New York, USA.
- Bernal, X., Guarnizo, C. y Luddecke, H. 2005. Geographic variation in advertisement call and genetic structure of *Colostethus palmatus* (Anura, Dendrobatidae) from the Colombian Andes. *Herpetologica* 61 (4): 395-408.
- Bridgeland, W.T., Beier, P., Kolb, T. y Whitham, T.G. 2010. A conditional trophic cascade: birds benefit faster growing trees with strong links between predators and plants. *Ecology* 91: 73–84.
- Brumfield, R. T. y Capparella, A. P. 1996. Historical diversification on birds in north-western South-America: A molecular perspective on the role of vicariant events. *Evolution* 50 (4): 1607-1624.
- Bonilla, D. y J. P. Feil. 1995. Production of ramets and germination of *Prestoea trichoclada* (Arecaceae) A source of palm heart in Ecuador. *Principes* 39: 210–214.
- Borchsenius, F., Borgtoft, H. y Balsev, H. 1998. *Manual to the palms of Ecuador*. Aarhus University Press. Denmark.
- Borgtoft-Pedersen, H. 1993. Extractivism in Ecuador with special emphasis on management and economic exploitation of native palm (Arecaceae). Tesis PhD.

Aarhus University, Denmark.

- Bower, A. V., 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of National Academy of Sciences* 91: 6491-6495.
- Burchsennius, F. y Morales, M. 2006. Diversidad y usos de palmeras Andinas (Arecaceae). *Botánica Económica de los Andes Centrales*; 412-433.
- Burczyk, J., DiFazio, S. P. y Adam W. T. 2004. Gene flow in forest trees: How far do genes really travel? *Forest Genetics* 11 (3-4): 179-192.
- Burneo, S. y C. Boada. 2012. MammaliaWebEcuador. Versión 2012.1. Museo de Zoología QCAZ, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. [<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/Mamiferos/MamiferosEcuador/default.aspx>]. [En línea]. 19/10/2013.
- Cardoso, S., R., Provan, J., Lira, C. F., Ramos, L. O., Ferreira, P. C. y Cardoso, M. A. 2005. High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity and Conservation* 14: 1047–1057, 2005.
- Cheviron, Z. A., Hackett, S. J., y Capparella, A. P. 2005. Complex evolutionary history of a Neotropical lowland forest bird (*Lepidothrix coronate*) and its implications for historical hypotheses of the origin of Neotropical avian diversity. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36: 338-357.
- Collevatti, G. R., Grattapaglia, D. y Hay, D. J. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 349-356.
- Cornuet J.M. y Luikart G., 1997 Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.

- Cornuet JM, y Luikart G. 1999. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Degen, B., Blanc L. Caron, H., Maggia, L., Kremer, A. y Gourlet-Fleury, S. 2006. Impact of selective logging on genetic composition and demographic structure of four tropical tree species. *Biological Conservation* 131: 386-401.
- Dorak, M. D. 2004. *Populations Genetics: Limits to Adaptation*. [<http://www.dorak.info/genetics/popgen.html>]. University of Tennessee, Knoxville, USA.
- Doyle, J.J, y Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11-15.
- Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M. y Lewis, C. 2005. A new Phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. *Kew Bulletin* 60 (4): 559-569.
- Duran, A. 1999. Las Palmas, una Estrategia de Vida Tropical. *Agroforestería para la Producción Animal en Latinoamérica*. Pag: 61-75.
- Ellstrand, N. 1992. Gene flow among seed plant population. Review paper. *New Forests* 6: 241-256.
- Ervik, F., y Feil, J. P. Reproductive biology of the monoecious understory plant *Prestoea schultzeana* in Amazonian Ecuador. *Biotropica*, 29 (3): 309-317.
- Escobar, S. 2011. Estructura genética de poblaciones transandinas de *Prestoea acuminata* (Willd.) H. E. Moore en los Andes septentrionales del Ecuador. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito, Ecuador.

- Espinoza, S. 2010. Variación histórica y espacial de la estructura genética de dos poblaciones de *Ceroxylon echinulatum* Galeano (palma de ramos, Arecaceae) bajo diferentes niveles de impacto humano en el occidente de la Provincia de Pichincha. Disertación previa a la obtención del título de licenciado en Ciencias Biológicas. PUCE. Quito, Ecuador.
- Estrada-Villegas, S. Perez-Torres, J. y Stevenson, P. 2007. Dispersión de semillas por murciélagos en un borde de bosque montano. *Ecotropicos* 20 (1): 1-14.
- Excoffier, L. G. Laval, y S. Schneider (2005) Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2009. Hacia una Definición de Degradación de los Bosques: Análisis Comparativo de las Definiciones Existentes. Simula, M. Italia, Roma. Documento de trabajo n° 154
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation. 2010. Global Forest Resources assessment. Roma. Main Report n°163.
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nation.. 2011. Assessing forest degradation, Towards the development of globally applicable guidelines. Forest Resources Assessment Working Paper 177. Rome.
- Favero, S., Souza, H.A. y Oliveira, A. 2011. Coleoptera (Insecta) as forest fragmentation indicators in the Rio Negro sub-region of the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 71, (1): 291-295.
- Fearnside, P. M. 1989. "Extractive Reserves in Brazilian Amazonia: An Opportunity to Maintain Tropical Rain Forest under Sustainable Use." *Bioscience* 39 (6): 187-393.
- Frankham, R., Ballou, J.D. y Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Freeland, J. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Ltd. England.
- Frumau, K.F.A., L.A. Bruijnzeel y C. Tobon. 2006. Hydrological measurement protocol formontane cloud forest. Annex 2, Final Technical Report DFID-FRP Project R7991. Vrije Universiteit, Amsterdam, 105.
- Foster, P. 2001. The potencial negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth Science Reviews* 5 (1-2): 73-106.
- Gaiotto, F., Brondani, R. y Grattapaglia, D. 2005. Microsatellite markers for heart of palm *Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). *Molecular Ecology* 1 (1-2): 86-88.
- Gamba-Triminiño C., Bernal R y Bittner J. 2011. Demography of the clonal palm *Prestoea acuminata* in the Colombian Andes: sustainable household extraction of palm hearts. *Tropical Conservation Science* 4: 386-404.
- Garza-Martinez, C. y Howe, F. H. 2003. Restoring tropical diversity: beating the time tax on species loss. *Forum. Journal of Applied Ecology* 40: 423-429.
- Gellen, S. I., Sanchez, J. F. y Malvido B. J. 2010. Structure of the advances regeneration community in tropical rain forest fragments on Los Tuxtlas, Mexico. *Biological Coservation* 143: 2111-2118.
- Grez, A. A., Zaviezo T., Díaz, Z., Camousseigt, B. y Cortés G. 2008. Effects of habitat loss and fragmentation on the abundance and species richness of aphidophagous beetles and aphids in experimental alfalfa landscapes. *European Journal of Entomol* 105: 411-420.
- Grubb, P. J y T.C. Whi tmore. 1996. «A Comparison of Montane and Lowland Rain Forest in Ecuador II: The Climate and its Effects on the Distribution and Physiognomy of the Forests». *The Journal of Ecology* 54 (2): 303-333.

- Goudet J. 1995. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* 86: 485-486.
- Gunderson, L.H. 2000. Ecological resilience: in theory and application. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 425-439.
- Hall, P., Walker, S. y Bawa, K. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in tropical tree, *Pithecellobium elegans*. *Conservation Biology* 10: 757-768.
- Hansen, M., Potapov P., Moore, R., Hancher M., Turubanova, S., Tyukavina, A., Thau, D., Stehman, S., Goetz, S., Loveland, T., Kommareddy, A., Egorov, A., Chini, L., Justice, C. y Townshend, J. K. 2013. High-Resolution Global Maps of 21st-Century Forest Cover Change. *Science* 342 (6160): 850-853.
- Henderson, A. 1986. *A Review of Pollination Studies in the Palmae*. The New York Botanical Garden. Bronx, New York,, USA. 52 (3).
- Henderson, A., Galeano, G. y Bernal, R. 1995. *Field Guide to the Palms of the Americas*. Princeton University Press, New Jersey, Estados Unidos.
- Herzog, S. y Kattan, G. H. 2013. Patterns of Diversity and Endemism in the Birds of the Tropical Andes. *Climate Change and Biodiversity in the Tropical Andes*. Inter-American Institute for Global Change Research. MacArthur Foundation. pp 245.
- Hoffmann, F. y Barker, J. 2003. Comparative phylogeography of short-tailed bats (*Carollia*: Phyllostomidae) *Molecular Ecology* 12: 3403-3414.
- Horgan, G. F. 2005 Effects of deforestation on diversity, biomass and function of dung beetles on the eastern slopes of the Peruvia Andes. *Forest Ecology and Management* 216 (1-3): 117-133.

- Husband, B. C. y Barrett, C. H. 1994. Estimates of gene flow in *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae): effects of range substructure. *Heredity* 75: 549-560
- I.B.M. SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows, Version 18.0. Chicago, SPSS Inc.
- Instituto Forestal y de Áreas Naturales y vida Silvestre (INEFAN). 1998. Informe Interino a la Secretaria del Convenio de Diversidad Biológica, Sobre la aplicación del Artículo 6. Dirección de Áreas Naturales y Vida Silvestre. Ecuador.
- Jolliffe, I. T. 2002. Principal Component Analysis. Springer-Verlag, New York, USA.
- Judd, W., Campbell, C., Kellogg, E., Stevens, P. y Donoghue M. 2002. Plant Systematics, A Phylogenetic Approach. Second Edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, USA.
- Keller, L.F. y Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution* 17: 230–241.
- Klein, B. 1989. Effects of forest fragmentation on dung and carrion beetle communities in Central Amazonia. *Ecology* 70 (6): 1715-17252.
- Knudsen, H. 1995. Demography, palm-heart extractivism, and reproductive biology of *Prestoea acuminata* (Arecaceae) in Ecuador. M.S. Tesis, Departamento de Sistemática Botánica, Universidad de Aarhus, Dinamarca.
- Lal, R. 1986. "Conversion of Tropical Rainforest: Agroeconomic Potential and Ecological Consequences." *Advances in Agronomy* 39: 173-264.
- Lamprecht, H. 1989. *Silviculture in the Tropics: Tropical Forestry Ecosystems and their Tree Species and Methods for Their Long Term Utilization*. Eschborn. Alemania Occidental.

- Larrea, A. D., Embert, D., Aguirre, L., Rios, B., Quintanilla, M., y Vargas, A. 2011. Spatial patterns of biological diversity in a neotropical lowland savanna of northeastern Bolivia. *Biodiversity and Conservation* 20: 1167-1182.
- Leblanc, H. R., Cueva, J. y Subia, E. 2006. Fijación de Carbono en palmas aceitera en la región tropical húmeda de Costa Rica. *Tierra Tropical* 2 (2): 197-202.
- Leyva, P. 2001. El medio Ambiente en Colombia. Instituto de hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. Ministerio del Medio Ambiente Colombia.
- Lowe, A., Harris, S. y Ashton, P. 2004. *Ecological Genetics: Design Analysis and Application*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, UK.
- Maruyama T. y Fuerst P.A., 1985 Population bottlenecks and non equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. *Genetics* 111:675-689.
- M.A.E., Ministerio del Ambiente. 2009. Bosque Protector “Mindo – Nambillo”. [<http://ambiente.gob.ec/userfiles/37/file/Bosques%20Protectores/PICHINCHA/BP%20MINDO%20NAMBILLO-.pdf>]. [En línea]. 20/01/2013.
- M.A.E., Ministerio de Ambiente del Ecuador. 2011. Aprovechamiento de recursos forestales en el Ecuador, procesos de infracciones y decomisos. Quito, Ecuador.
- M.A.E., Ministerio del Ambiente. 2012. Línea Base de Deforestación del Ecuador Continental Quito Ecuador. [<http://sociobosque.ambiente.gob.ec/files/Folleto%20mapa-parte1.pdf>]. [En línea]. 20/03/2013.
- McEachern, B. M., Vuren D. H., Floyd C. H., May B. y Eadie, J. M. 2011. Bottlenecks and rescue effects in a fluctuating population of golden-mantled ground squirrels (*Spermophilus lateralis*). *Conservation Genetics* 12: 285-296.

- Mimura, M., Barbour, R.C., Potts, B.M., Vaillancourt, R.E. y Watanabe K.N. 2009. Comparison of contemporary mating patterns in continuous and fragmented *Eucalyptus globulus* native forests. *Molecular Ecology* 18 (20): 4180-4192.
- Montúfar, R., Mariac, C., Pham, J. y Pintaud, J. 2006. Isolation of 23 polymorphic microsatellite loci in the Neotropical palm *Oenocarpus bataua* Martius (Arecaceae). *Molecular Ecology* 7 (1): 75-78.
- Morden, C.W. y Loeffler, W. 1999. Fragmentation and genetic differentiation among subpopulations of the endangered Hawaiian mint *Haplostachys haplostachya* (Lamiaceae). *Molecular Ecology* 8: 617-625.
- Murcia C. 1995. Edge effects in fragmented forests: Implications for conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 10 (2): 58-62.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A. y Kent, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Naranjo, E., y Dirzo, R., 2009. Impacto de los factores antropogénicos de afectación directa a las poblaciones silvestres de flora y fauna, en Capital natural de México vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 247-276.
- Nathan, R. y Landau-Muller, C. 2000. Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolutions* 15 (7): 278-285.
- Nason J. D y Hamrick J. L. 1997. Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. *Journal of Heredity* 8: 264-276.
- Nei, M. 1972. Genetic Distance between populations. *The American Naturalist* 106 (949): 283-292.

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceeding of National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- Norman C., y Elam, D. R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology & Systematic* 24: 217-42.
- Obayashi, K., Tsumura, Y., Ihara-Ujino, T., Niiyama, K., Tanouchi, H., Suyama, Y., Washitani, I., Lee, C., Lee, S. L., y Muhammad N. 2002. Genetic diversity and outcrossing rate between undisturbed and selectively logged forests of *shorea curtisii* (Dipterocarpaceae) using microsatellite DNA analysis. *International Journal of Plant Sciences* 163 (1): 151-158.
- Ouin, A., Sarthou J. P., Bouyjou, B., Deconchat, M., Lacombe J. P. y Monteil C. 2006. The species-area relationship in the hoverfly (Diptera, Syrphidae) communities of forest fragments in southern France. *Ecography* 29: 183-190.
- Paredes R. D., Montúfar G. R., y Meilby H. 2012. Effects of micro-environmental conditions and forest disturbance on the establishment of two Andean palms in Ecuador. *Open Journal of Ecology* 2 (4): 233-243.
- Pautasso, M. 2008. Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Sytematic* 11: 157-189.
- Peakall, R. and Smouse P.E. (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pereira, A. A., Clement, C. R. y Rodrigues, D. P. 2012. Genetic divergence among populations and accessions of the spineless peach palm from Pampa Hermosa landrace used in the heart-of-palm agribusiness in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* 35 (2): 474-479.

- Pintaud J. C., Galeano, G., Balslev, h., Bernal, R. Borchsenius, F., Ferreira, E. de Granville, J. J. Mejia, K., Millan, B., Morales, M., Noblick, L., Stauffer, F. W. y Kahn, F. 2008. Las palmeras de America del Sur: distribucion e historia evolutiva. *Revista Peruana de Biología* 15 (1): 7-29.
- Pouns, A., Fogden, L. P. M., y Campbell, H. J. 1999. Biological response to climate change on tropical mountain. *Nature* 398: 611-615.
- Quinn, G. y M. Keough. 2002. *Experimental Design and Data Analysis for Biologist*. Cambridge University, Cambridge, UK.
- Raijmann, L.E.L., Van Leeuwen, N.C., Kersten, R., Oostermeijer, J.R.B., Den Nijs, H.C.M. y Menken, S.B.J. 1994. Alleleic variation and outcrossing rate in relation to population size in *Gentiana pneumonanthe* L. *Conservation Biology* 8: 1014-1026.
- Raymond M. y Rousset F, 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.
- REDD+, Reducing Emissions from Deforestation and Forest Degradation. 2012. Ecuador, Un resumen de REDD Countries Database. [http://www.ecodecision.com.ec/pdfs/REDD_Countries_Database.pdf]. [En línea]. 05/09/2013.
- Revelo, L. 2002. *La Conservación y uso sustentable de la biodiversidad en el Ecuador*. Tesis presentada como requisito para optar al Título de Máster en Seguridad y Desarrollo con mención en Gestión Pública y Gerencia Empresarial. Instituto de los Altos Estudios Nacionales. Ecuador.
- Rhoades, R. 2001. *Tendiendo puentes entre los paisajes humanos y naturales*. Ediciones Abya – Yala. Quito, Ecuador.
- Richardson, P. y Richardson D. 2010. Dung beetles and their effects on soil. *Ecological Restoration* 18: 116-117.

- Ridgely, R. y Greenfield, P. 2006 Aves del Ecuador, Guía de campo. Volumen II. Fundacion de conservación Jocoto. Ecuador.
- Ríos, M., Koziol, M., Pedersen, H. y Granda G. 2007. Plantas útiles de Ecuador, aplicaciones retos y perspectivas. Primera edición. Abya-Yala. Quito, Ecuador.
- Rodríguez P. D., Montúfar G. R., y Meilby H. 2012. Effects of micro-environmental conditions and forest disturbance on the establishment of two Andean palms in Ecuador. *Open Journal of Ecology* 2: 233-243.
- Ron, S. R., Guayasamin, J. M., Yanez-Muñoz, M. H. y Merino-Viteri, A. 2013. AmphibiaWebEcuador. Version 2013.1. Museo de Zoología, Pontificia Universidad Católica del Ecuador. [<http://zoologia.puce.edu.ec/vertebrados/anfibios/AnfibiosEcuador/DiversidadEndemismo.aspx>]. [En línea], 03/12/2013.
- Sadeghian, S., Rivera, J. y Gomez, M. 2009. Impacto de sistemas de ganadería sobre las características físicas, químicas y biológicas de suelos en los Andes de Colombia. Conferencia electrónica de la FAO sobre “Agroforesteria para la producción animal en Latinoamérica”.
- Saout, S., Hoffmann, M., Shi, Y., Hughes, A., Bernard, C., Brooks, M. T., Bertzky, B., Butchart, S., Stuart, S., Badman, T. y Rodrigues A. 2013. Protected Areas and Effective Biodiversity Conservation. *Sciences* 342: 803-806.
- Sauders, D. A., Hobbs, R. J. y Margules, C. R. 1991. Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* 5: 18-32.
- Scariot A. 1999. Forest fragmentation on palm diversity in central Amazonia. *Journal of Ecology* 87: 66-76.
- Sezen, U., Chazdon, R. L. y Holsinger, K. E. 2005. Genetic Consequences of Tropical Second-Growth Forest Regeneration. *Science* 307 (5711): 891.

- Shaberg, G. P., DeHayes, H. D., Hawley, J. G. & Nijensohn, E. S. 2008. Anthropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management* 256: 855-862.
- Sierra, R. 2001. The role of domestic timber markets in tropical deforestation and forest degradation in Ecuador: Implication for conservation planning and policy. *Ecological Economics* 36: 327-340.
- Svenning, J. 1998. The effect of land-use on the local distribution of palm species in an Andean rain forest fragment in northwestern Ecuador. *Biodiversity and Conservation* 7: 1529-1537.
- Svenning, J. 1999. Microhabitat specialization in a species-rich palm community in Amazonian Ecuador. *Journal of Ecology* 87: 55-65.
- Thompson, I., Mackey, B., & McNulty, S., Mosseler, A. 2009. Forest Resilience, Biodiversity, and Climate Change. A synthesis of the biodiversity/resilience /stability relationship in forest ecosystems. Secretariat of the Convention on Biological Diversity, Montreal, Canada. Technical Series 43: 68.
- Thompson, I. 2011. Biodiversidad, umbrales ecosistémicos, resiliencia y degradación forestal. *Unasylva* 238 (62): 25-30
- Trenel, P., Hansen, M., Norman, S. & Borchsenius, F. 2008. Landscape genetics, historical isolation and cross-Andean gene flow in the wax palm *Ceroxylon equinulatum* (Araceae). *Molecular Ecology* 17: 3528-3540.
- Tobón, C. & Morales, G. G., 2007. Capacidad de interpretación de la niebla por la vegetación de los Paramos Andinos. *Avances en recursos Hidráulicos*. Numero 15.
- Torres-Carvajal, O., D. Salazar-Valenzuela y A. Merino-Viteri. 2013. *ReptiliaWebEcuador*. Versión 2013.1. Museo de Zoología QCAZ, Pontificia

- Universidad Católica del Ecuador. [<http://zoologia.puce.edu.ec/Vertebrados/reptiles/reptilesEcuador>]. [En línea]. 2013-10-19.
- Tylianakis, J.M., Rand, T.A., Kahmen, A., Klein, A.-M., Buchmann, N., Perner, J. y Tschardtke, T. 2008. Resource heterogeneity moderates the biodiversityfunction relationship in real world ecosystems. *PLoS Biology* 6 (5): e122.
- Universidad Técnica Particular de Loja (UTPL). 2002. Guia didáctica: Realidad Nacional y Ambiental. [<http://rsa.utpl.edu.ec/material/215/G16101.2.pdf>]. [En línea]. 2013-06-10.
- Van den Eynden, V., Cueva, E. y Cabrera, O. 2004. Edible Palms of Southern Ecuador. *Palms* 48 (3): 141-147.
- Van Rossum, F., De Sousa, S.C. y Triest, L. 2004. Genetic consequences of habitat fragmentation in an agricultural landscape on the common *Primula veris*, and comparison with its rare congener, *P. vulgaris*. *Conservation Genetics* 5: 231-245.
- Villegas, S., Torres J. y Stevenson P. 2007. Dispersión de semillas por murciélagos en un borde de bosque montano. *Ecotrópicos* 20 (1): 1-14.
- Weigt, L. A., Crawford A. J., Rand, A. S., y Ryan M. J., 2005. Biogeography of the Tungurahua Frog, *Physalaemus pustulosus*: a molecular perspective. *Molecular Ecology* 14: 3857-3876.
- Willmott, K. R., y J. P. W. Hall. 2010. A new species of *Dynamine* Hübner, [1819] from northwestern Ecuador (Lepidoptera: Nymphalidae: Biblidinae). *Tropical Lepidoptera Research* 20: 23-27.
- Yeh, F. C., Yang, R-C., Boyle, T., Ye, Z-H., y Mao, J.X. . 1997. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Niotechnology Center, University of Alberta, Alberta, Canada.

Young, A., Boyle, T. y Brown, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 413–418.

Zamudio, K. R., y Greene, H. W. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae) implications for neotropical biogeography, systematic and conservation. *Biological Journal of the Linnean Society* 62: 421-442.

10. FIGURAS



Figura 1. Individuo juvenil de *Prestoea acuminata*. Flores y frutos de la palma.

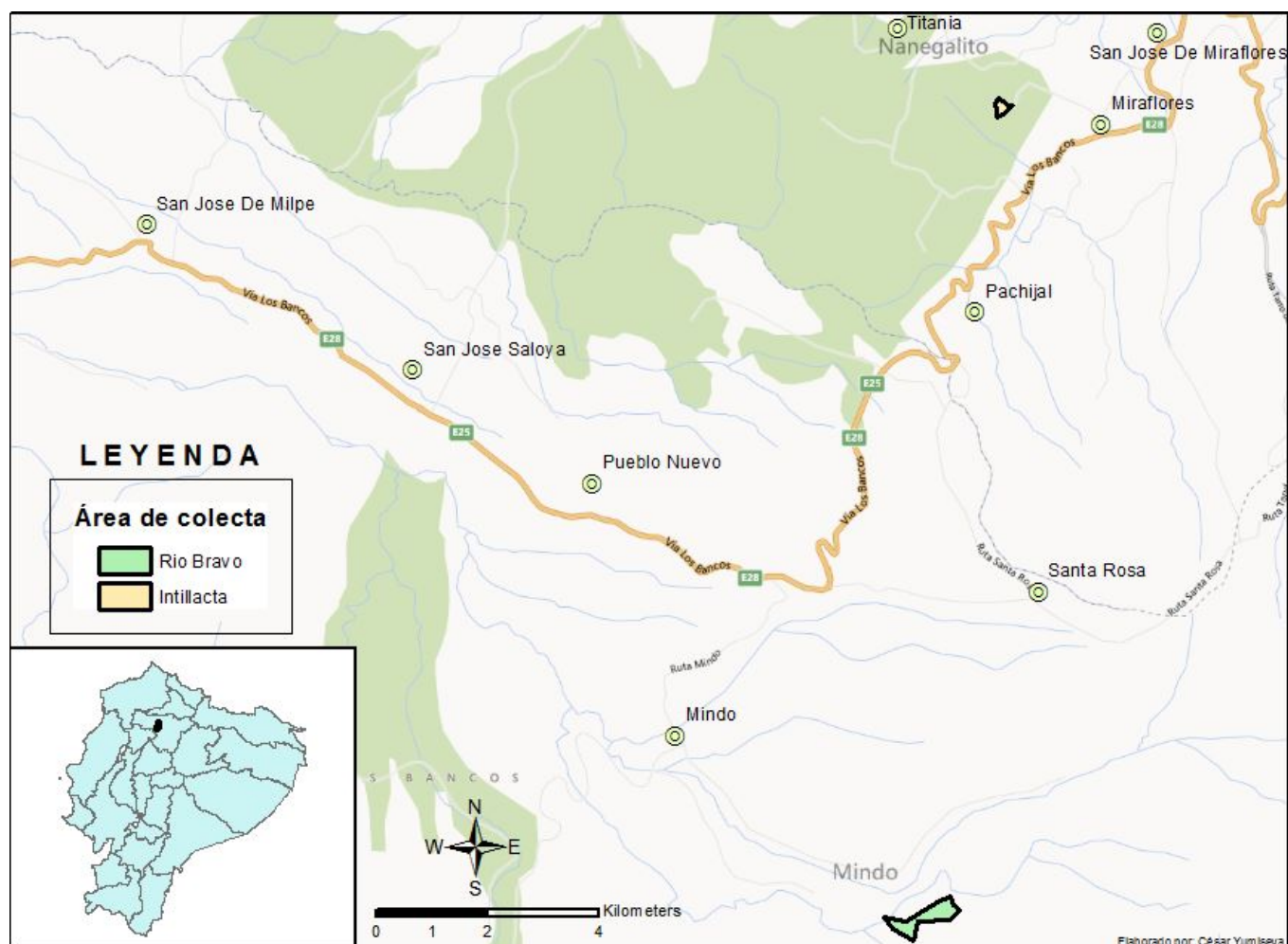


Figura 2. Mapa de las dos localidades seleccionadas por diferentes niveles de impacto humano: reserva Inti Llacta, Nanegalito, $00^{\circ}02'N$, $78^{\circ}43'W$ (bosque disturbado), y reserva Río Bravo, $00^{\circ}04'S$, $78^{\circ}44'W$ (bosque no disturbado). Las dos localidades estas separadas por 20 km.

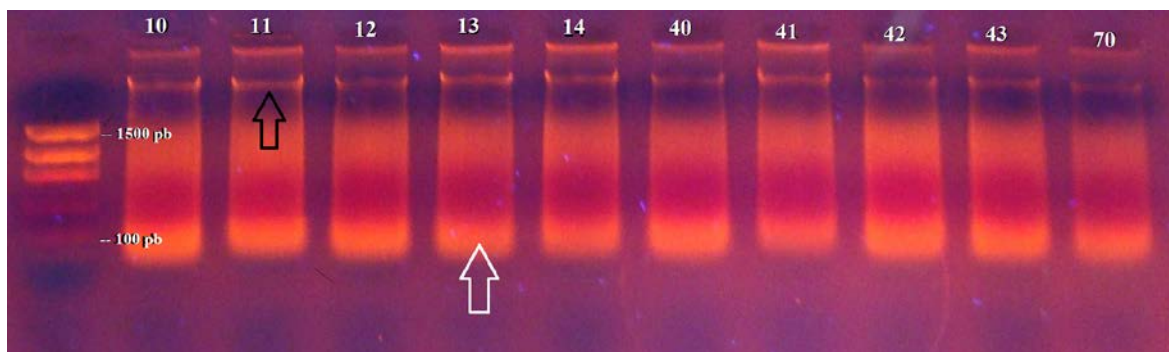


Figura 3. Verificación de calidad y cantidad de ADN en un gel de agarosa al 1% para muestras de plántulas, juveniles y adultos de *P. acuminata*, población de Inti Llacta. La flecha negra señala la banda de ADN extraído y la flecha blanca residuos de la muestra.

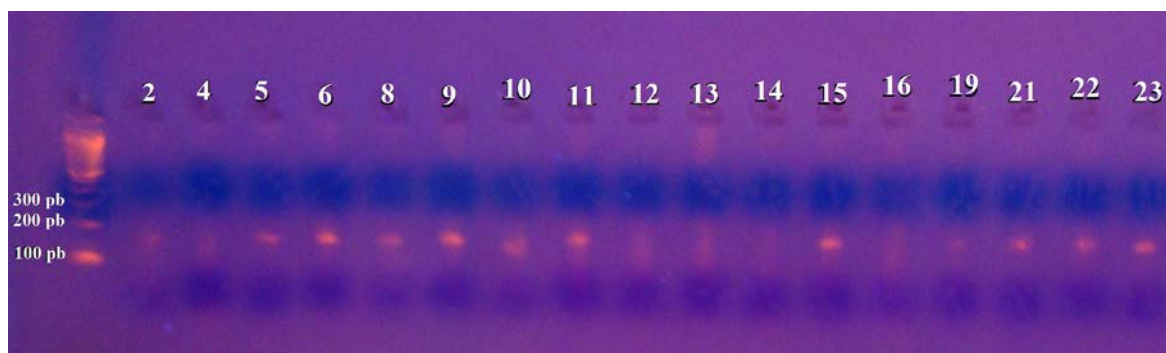


Figura 4. Gel de agarosa al 3% para la amplificación del primer AG5-5#6 (*Euterpe edulis*) en 23 individuos de *P. acuminata* en la población de Inti Llacta. Las bandas pertenecientes al microsatélites amplificado tienen un peso relativo de 153 pb.

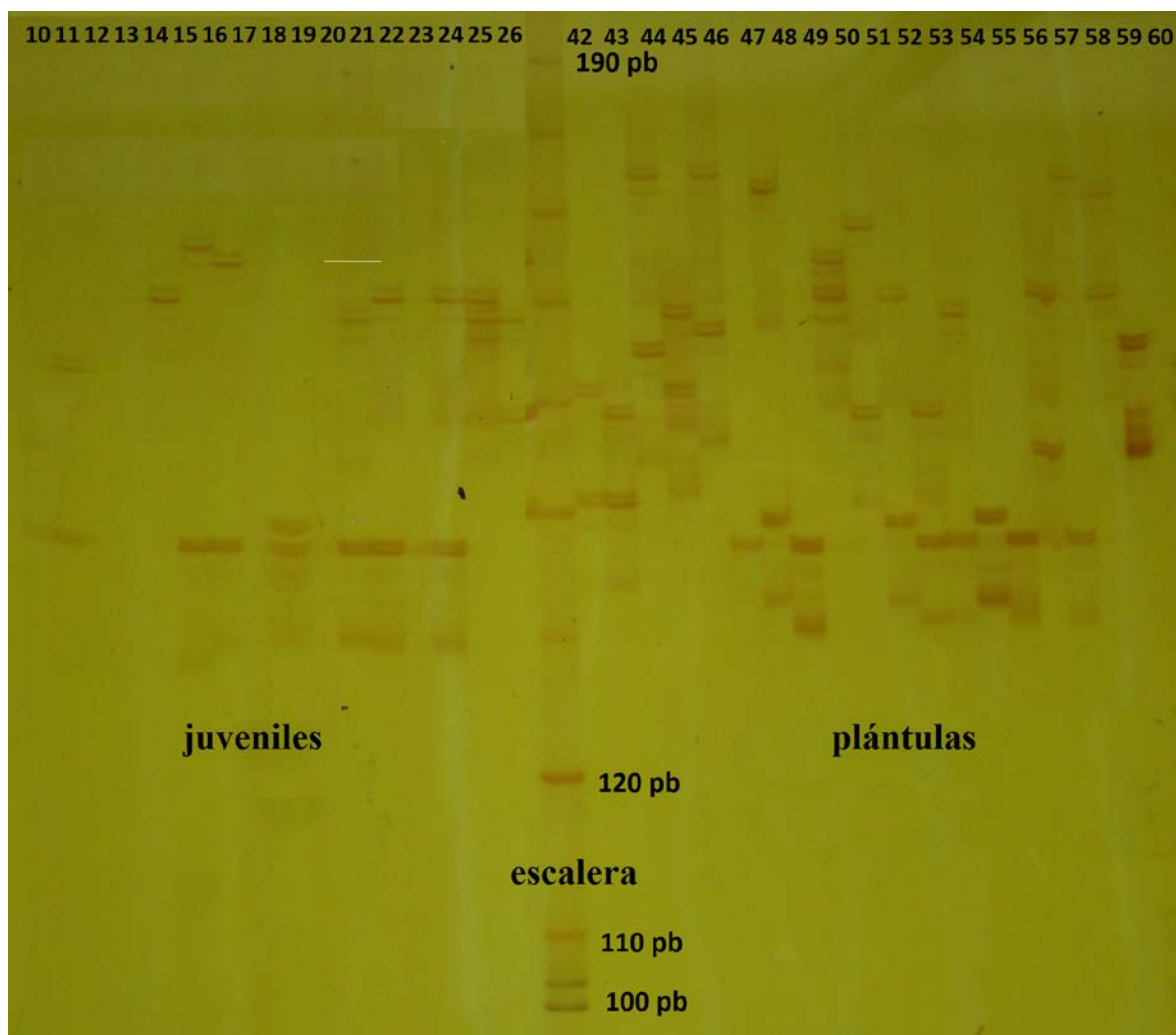


Figura 5. Amplificación en gel de poliacrilamida al 6% del locus Ob22 (Microsatélite más polimórfico) para juveniles y plántulas de la población de Inti Llacta (bosque disturbado). Gel dividido por una escalera de pesos (30-330 bp AFLP DNA Ladder de Invitrogen).

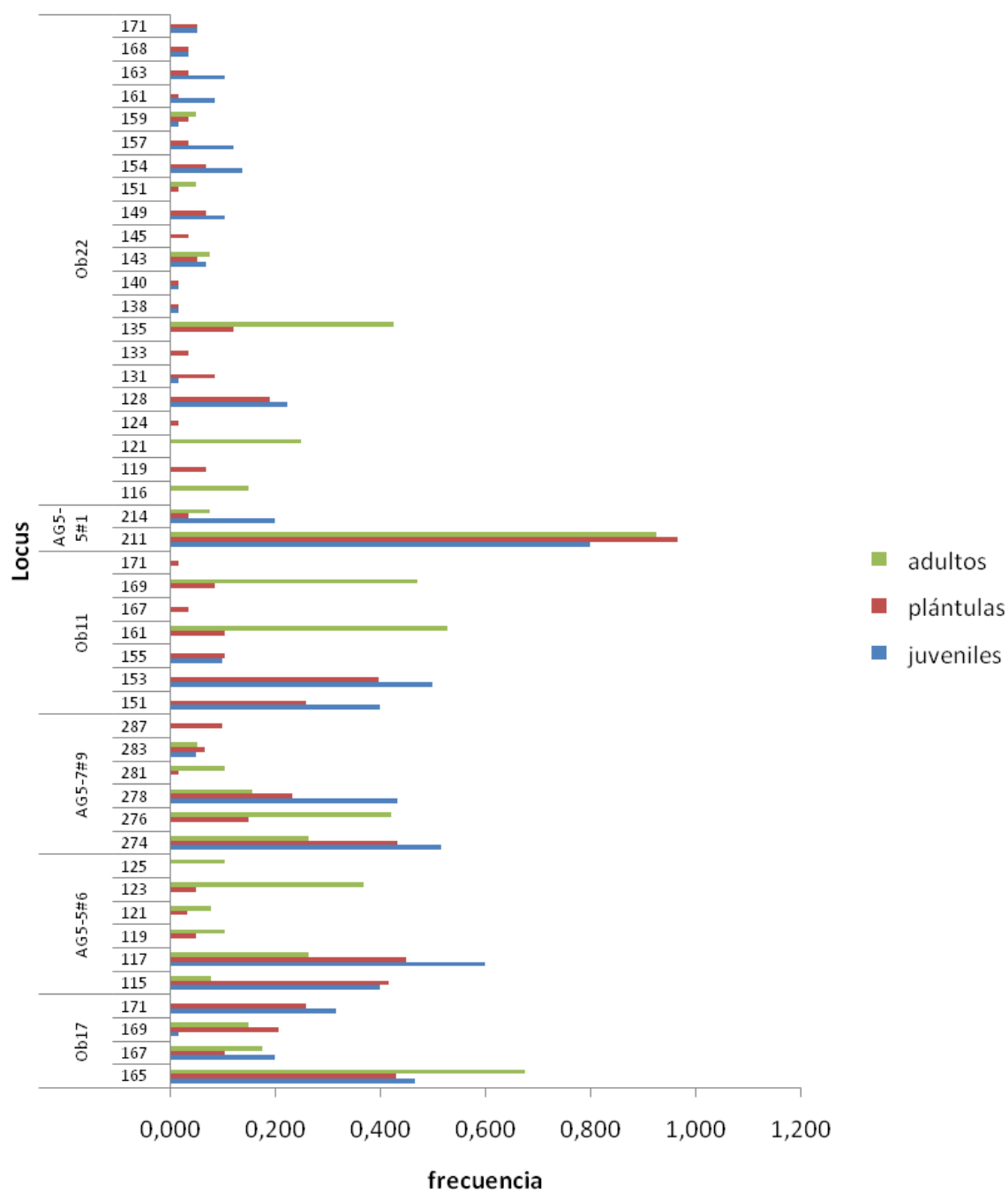


Figura 6. Frecuencias alélicas de todos los Loci por cohorte en la población de Río Bravo (bosque no disturbado, n=80). GenAlex 6.5 (Peakall, y Smous, 2012).

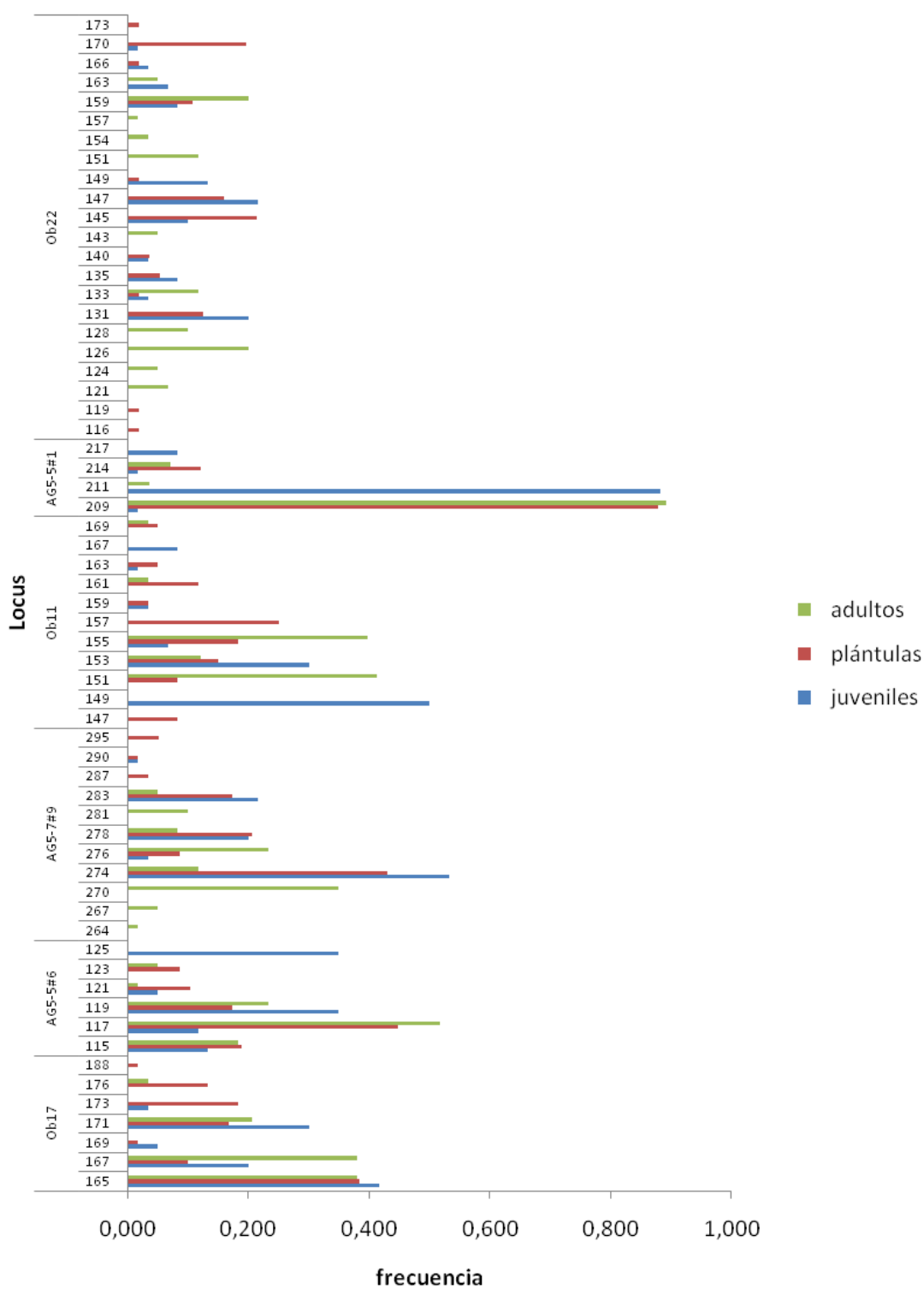


Figura 7. Frecuencias alélicas de todos los loci por cohortes en la población de Inti Llacta (bosque disturbado, n=90). GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

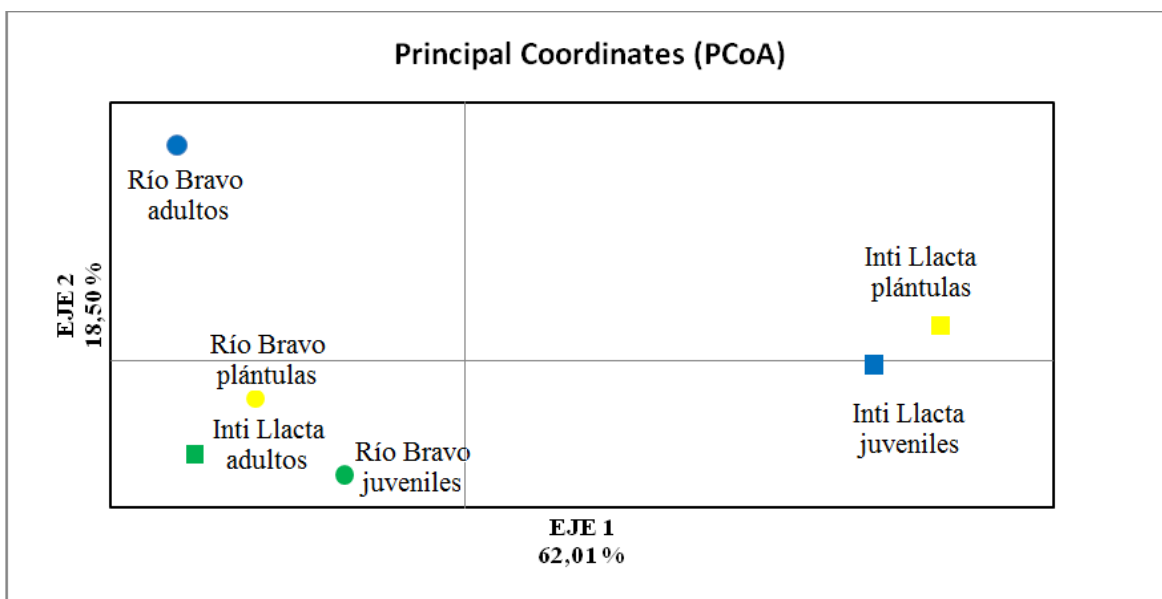


Figura 8. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con la distancia genética de Nei para las tres cohortes (adultos, juveniles y plántulas) en las dos poblaciones: Inti Llacta (BD) y Río Bravo (BnD).

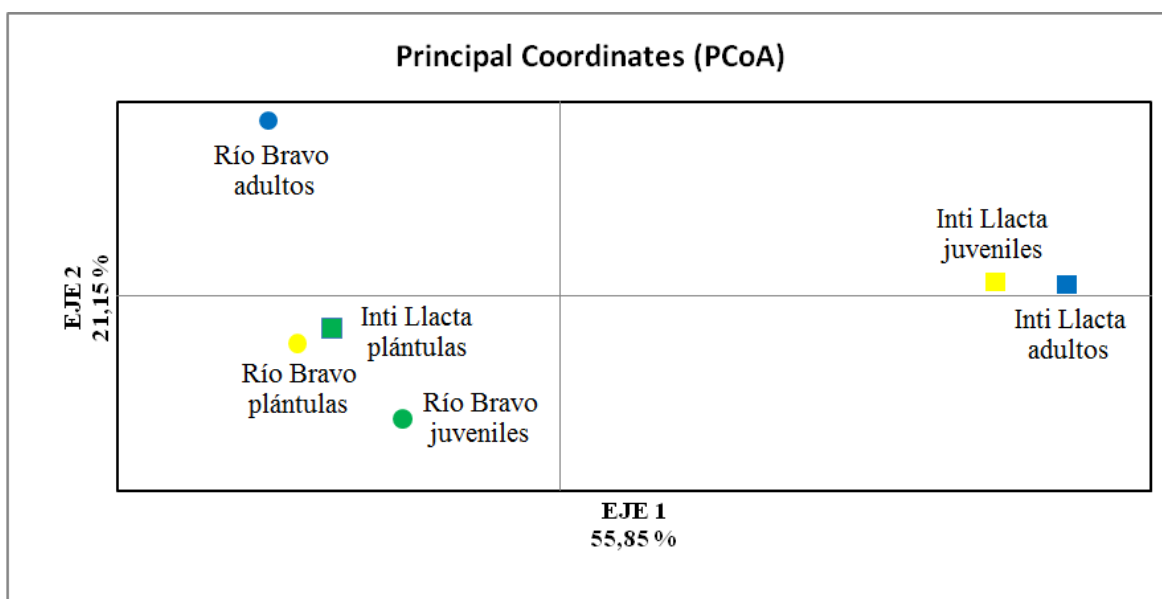
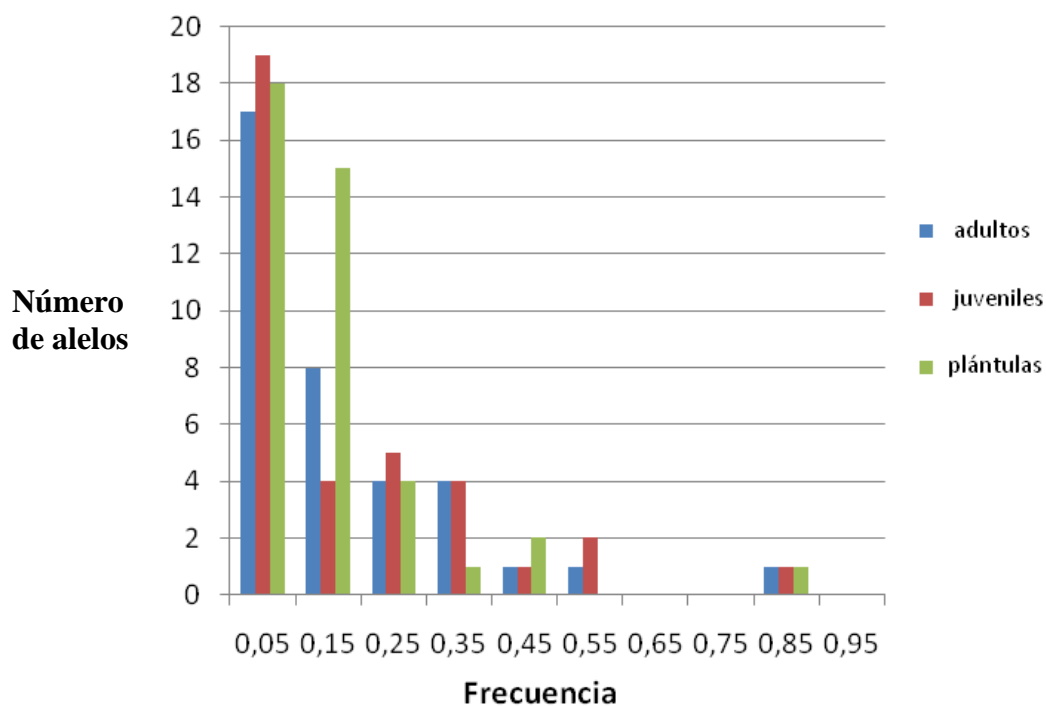


Figura 9. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con los índices F_{st} y Nei (1972) para las tres cohortes (adultos, juveniles y plántulas) en las dos poblaciones: Inti Llacta (BD) y Río Bravo (BnD).

Inti Llacta



Río Bravo

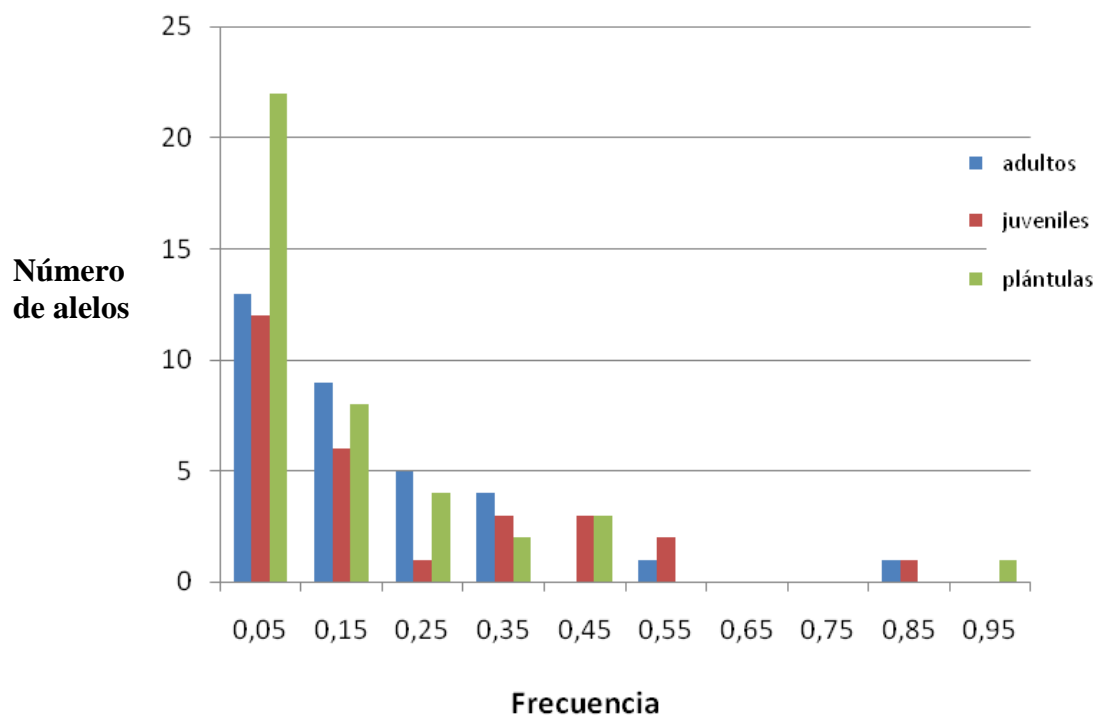


Figura 10. Gráfico de Bottleneck para todos los cohortes basados en la frecuencia alélica de los seis loci para las dos poblaciones (Inti Llacta, n=90 y Río Bravo, n=80) Bottleneck 1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1999).

11. TABLAS

Tabla 1. Primers amplificados bajo el protocolo PCR original

Locus	Motivo	Secuencia Primer	Tamaño (pb)	Autor	Amplificación
Ob17 (H2(5a))	(GA)16	TAGCTTTAGAGCGAGGGACT TGAGCCATAGAACTGACCTT	150-170	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Polimórfico utilizado
Ob22	(GA)5-(GATA)9-(GA)17	TTTGGATTGTCAAAACCACTG ATCTCTTGCTTGCGGTCAAT	190-233	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Polimórfico utilizado
Ob19	(GA)18	CCGAATCTCACCTAAACAAG CACCACCTAACACTTTCTTTG	193-233	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Monomórfico no utilizado
Ob11	(GA)14	ATGAGGGATGTCAATGGAT AAAATTCTCCTCTCGCTCTT	145-185	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Polimórfico utilizado
Ob17	(GA)16	TAGCTTTAGAGCGAGGGACT TGAGCCATAGAACTGACCTT	140-160	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Monomórfico no utilizado
Ob03	(GA)14	ATTGTTTCCAGTCATCATCC TTGCAAGACAATTCGTAGA	110-133	Montúfar <i>et al.</i> , 2006	Monomórfico no utilizado
AG5-5#1	GA*	GACTGGTTATGAATCTTAGCCTC AAATCCATGCTCCATAGTCC	200-210	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2004	Polimórfico utilizado
AG5-5#6	*	CGGACCAGTGTGGGTGTAAG TGGCAGAAAGGAATCTATGCA	105-115	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2004	Polimórfico utilizado
AG5-7#9	AG*	GACATGGTTAGTAGTTATGAGGC TCTTCATGGTAGATGGCTTG	290-340	Lepsch-Cunha <i>et al.</i> , 2004	Polimórfico utilizado

Tabla 2. Valores de probabilidad obtenidos para el desequilibrio ligado (linkage disequilibrium), bajo una significancia de 0.05 y 0.01 de todos los locus para la población de Inti Llacta (bosque disturbado) y Río Bravo (bosque no disturbado). GenPop 1.2 (Raymond y Rousset , 1995).

Poblaciones	Locus pair		Chi2	df	P-Value	Sig
Bosque disturbado	Ob17	AG5-7#9	14.475.371	6	0.024754	*
	Ob17	Ob22	15.141.304	6	0.019186	*
	AG5-7#9	Ob22	20.095.618	6	0.002663	**
	Ob11	Ob22	15.943.706	6	0.014059	*
Bosque no disturbado	Ob17	AG5-5#6	17.678.274	6	0.007089	**
	AG5-5#6	AG5-7#9	22.304.389	6	0.001066	**
	Ob17	Ob22	13.219.900	6	0.039674	*
	AG5-5#6	Ob22	15.378.983	6	0.017505	*

Sig.: **p < 0.01, *p < 0.05 (p > 0.05)

Tabla 3. Análisis de desequilibrio ligado (Linkage disequilibrium) por cohortes para la población bosque disturbado y de bosque no disturbado para todos los loci.

Población	Estadios	Locus#1	Locus#2	P-Value	Sig.
BD	Juveniles	Ob17	AG5-7#9	0.012290	*
	Juveniles	Ob17	Ob22	0.007950	**
	Juveniles	AG5-5#6	Ob22	0.033650	*
	Juveniles	AG5-7#9	Ob22	0.018090	*
	Plántulas	Ob17	Ob11	0.020890	*
	Adultos	AG5-7#9	Ob22	0.037030	*
	Adultos	Ob11	Ob22	0.005960	**
BnD	Juveniles	Ob17	AG5-5#6	0.01901	*
	Plántulas	AG5-5#6	AG5-7#9	0.001220	**
	Plántulas	Ob17	Ob11	0.042780	*
	Adultos	AG5-5#6	Ob22	0.002500	**

Sig.: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ ($p > 0.05$)

Tabla 4. Número de alelos absolutos (A_o) por las dos poblaciones analizadas, bosque disturbado y bosque no disturbado.

Locus	Bosque disturbado (n=90)	Bosque no disturbado (n=80)
Ob17	7	4
AG5-5#6	6	6
AG5-7#9	11	6
Ob11	11	7
AG5-5#1	4	2
Ob22	22	21
Total	61	46

Tabla 5. Sumatoria de alelos privados con sus respectivas frecuencias entre las dos poblaciones (bosque disturbado y bosque no disturbado). GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

Población	Estadío	Locus	Alelo	Freq.	
BD	Plántulas	Ob17	188	0,017	
	Plántulas	AG5-7#9	295	0,052	
	Plántulas	Ob11	147	0,083	
	Plántulas	Ob11	157	0,25	
	Plántulas	Ob22	173	0,018	
	Juveniles	Ob11	149	0,5	
	Juveniles	AG5-5#1	217	0,083	
	Adultos	AG5-7#9	264	0,017	
	Adultos	AG5-7#9	267	0,05	
	Adultos	AG5-7#9	270	0,3	
	Adultos	Ob22	126	0,2	
	BnD	Plántulas	Ob11	171	0,017

Tabla 6. Número de muestras, Riqueza alélica (R_s), número efectivo de alelos, promedio de heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), coeficiente de endogamia F_{is} y % de alelos polimórficos en los seis loci para las dos poblaciones; Inti Llacta (bosque disturbado) y Río Bravo (bosque no disturbado), de *P. acuminata*. GenAlex 6.5 (Peakall, y Smous, 2012) y Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

	<u>N°</u>		<u>R_s</u>		<u>N° efectivo</u>	<u>H_o</u>		<u>H_e</u>		<u>F_{is}</u>		<u>% de alelos</u>
	<u>muestras</u>	<u>Sig.</u>		<u>Sig.</u>	<u>de alelos Ne</u>		<u>Sig.</u>		<u>Sig.</u>		<u>Sig.</u>	<u>polimórficos</u>
Bosque disturbado	90	ns	10,5	ns	5,74	0,52	*	0,77	*	0,181	*	100,00%
Bosque no disturbado	80		7,66		4,52	0,61		0,65		-0,02		100,00%

Sig.: ** = $p < 0.01$, * = $p < 0.05$ y ns (no significativo) = ($p > 0.05$) entre las dos poblaciones.

Tabla 7. Análisis de cuello de botella bajo el modelo Probabilístico Two-Phases Model (T.P.M.) para los diferentes cohortes (adultos, juveniles y plántulas) entre dos poblaciones (bosque disturbado y bosque no disturbado). Bottleneck 1.2.02. (Cornuet y Luikart, 1999)

Poblaciones	Cohortes	Probabilidad
		Bajo T.P.M
BD	Adultos	0.57813
	Juveniles	0.65625
	Plántulas	0.42188
BnD	Adultos	0.218755
	Juveniles	0.00781**
	Plántulas	0.65625

Tabla 8. Número de alelos absolutos (A_o) por cada cohorte por locus en cada población analizada GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

Locus	Bosque disturbado (BD)			Bosque no disturbado (BnD)		
	plántulas (n=30)	juveniles (n=30)	adultos (n=30)	plántulas (n=30)	juveniles (n=30)	adultos (n=20)
Ob17	7	5	4	4	4	3
AG5-5#6	5	5	5	5	2	6
AG5-7#9	7	5	9	6	3	5
Ob11	9	6	5	7	3	2
AG5-5#1	2	4	3	2	2	2
Ob22	13	11	11	19	13	6
Total	43	36	37	43	27	24

Tabla 9. Número de alelos privados y alelos efectivos para las dos poblaciones bosque disturbado y bosque no disturbado. GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

	Alelos Privados			N_e (Numero efectivo de alelos)		
	Adultos	Juveniles	Plántulas	Adultos	Juveniles	Plántulas
Bosque disturbado (BD)	2,17	0,67	1,33	3,84	3,49	4,37
Bosque no disturbado (BnD)	0,50	0,00	1,17	2,74	3,15	4,34

Tabla 10. Número de muestras, riqueza alélica (R_s), promedio de heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada de Neil (H_e) y coeficiente de endogamia (F_{is}) para seis loci en las dos poblaciones; Inti Llacta (bosque disturbado) y Río Bravo (bosque no disturbado), para adultos (A), juveniles (J) y plántulas (P) de *P. acuminata*. GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012) y Arlequin 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

	N° muestras			R_s				H_o				H_e				F_{is}			
	A	J	P	A	J	P	sig.	A	J	P	sig.	A	J	P	sig.	A	J	P	sig.
Bosque disturbado (BD)	30	30	30	6,18	6	7,17	ns	0,5	0,48	0,56	ns	0,64	0,63	0,69	Ns	0,21	0,22	0,15	ns
Bosque no disturbado (BnD)	20	30	30	4	4,5	7,17	ns	0,49	0,63	0,64	ns	0,55	0,57	0,63	Ns	0,05	-0,09	-0,03	ns

Sig.: * = $p < 0.05$ y ns (no significativo) = ($p > 0.05$), los valores de significancia obtenidos son comparados entre los cohortes de cada población.

Tabla 11. Relación genética para el flujo promedio migratorio en los diferentes cohortes (plántulas, juveniles y adultos) para el número de migrantes (Nm). GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

Inti Llacta (BD)			Río Bravo (BnD)			Poblaciones
juveniles	plántulas	adultos	juveniles	plántulas	adultos	
0	*	*	*	*	*	Estadíos juveniles
0,94	0	*	*	*	*	plántulas Inti Llacta (BD)
0,71	3,03	0	*	*	*	adultos
1,51	0,94	0,85	0	*	*	juveniles
2,32	1,05	0,92	9,85	0	*	plántulas Río Bravo (BnD)
1,15	0,76	0,66	0,9	1,74	0	adultos

Tabla 12. Diferenciación genética en los diferentes cohortes (plántulas, juveniles y adultos) basada en los índices de fijación (F_{st}). GenAlex 6.5 (Peakall y Smous, 2012).

Inti Lacta (BD)			Río Bravo (BnD)			Poblaciones	
juveniles	plántulas	adultos	juveniles	plántulas	adultos	Estadíos	
0	*	*	*	*	*	juveniles	
0,21	0	*	*	*	*	plántulas	Inti Lacta (BD)
0,25	0,07	0	*	*	*	adultos	
0,14	0,21	0,22	0	*	*	juveniles	
0,09	0,19	0,21	0,02	0	*	plántulas	Río Bravo (BnD)
0,17	0,24	0,27	0,21	0,12	0	adultos	

12. ANEXOS

ANEXO 1. Número de individuos de *Prestoea acuminata* recolectados para los análisis moleculares.

Código del individuo	Cohorte	Tipo de bosque	Localidad	Total
001-030	juveniles	disturbado	Inti Llacta	30
031-060	plántulas	disturbado	Inti Llacta	30
061-090	adultos	disturbado	Inti Llacta	30
091-120	juveniles	no disturbado	Río Bravo	30
121-150	plántulas	no disturbado	Río Bravo	30
151-170	adultos	no disturbado	Río Bravo	20
				n=170

ANEXO 2. REACTIVOS

2.1 REACTIVOS PARA EXTRACCIÓN DE ADN SEGÚN EL PROTOCOLO DOYLE & DOYLE (1987)

Buffer de extracción (100ml)

- 1,214gr Tris HCl base (pH 8; 0,1M)
- 2,22gr Na₂ EDTA*H₂O (0,03M)
- 8,18gr NaCl (1,4M)
- 4,0gr CTAB

Aforados en 100ml de agua MilliQ, para que EDTA se disuelva completamente debe estar en pH 8 la solución.

2.2 REACTIVOS PARA REALIZACIÓN DE GELES Y LECTURA

Buffer TE

- 10mM Tris-HCl pH 8,0
- 0,1mM EDTA)

Buffer TBE 10X (1000ml)

- 108gr Tris HCl base
- 55gr Ácido Bórico
- 9,3gr Na₂ EDTA *H₂O

Aforados en 1 litro de agua MilliQ. El pH de esta solución debe ser de 8,3 sin ajustes.

Buffer de carga (agarosa)

- Azul de bromofenol 0,03%
- Cianol xileno FF 0,03%
- Glicerol 30%

Acrilamida 30% (500ml)

- 142,5gr Acrilamida
- 7,5gr Bis-acrilamida

Aforados en 500ml de agua MilliQ. Desgasar, filtrar y almacenar a 4°C.

Acrilamida 6% Úrea 5M (500ml)

- 150,15gr Úrea (5M)
- 100ml Acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 30%

Aforar a 500ml con agua MilliQ.

Polimerización de acrilamida

- 90ml Acrilamida 6% úrea 5M
- 250µl Persulfato de amonio al 10%
- 100µl Temed

2.3 REACTIVOS PARA LA TINCIÓN DE GELES**Solución fijadora-paradora (Ácido Acético 10%) (2,5 litros)**

- 250ml Ácido Acético glacial
- 1750ml agua MilliQ

Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Solución de coloración (2,5 litros)

- 2,5gr Nitrato de Plata
- 3,5ml Formaldehído al 37%

Aforados a 2,5 litros de agua MilliQ. Almacenar a temperatura ambiente y en oscuridad.

Solución reveladora (2,5 litros)

- 75gr Carbonato de Sodio
- 3,5ml Formaldehído
- 500µl Tiosulfato de Sodio al 1,5%

Aforados a 2,5 litros de agua MilliQ. Almacenar a 4°C y en oscuridad.

Escalera 30-330 AFLPs®

- 5µl Escalera Mix de Reacción de 30-330 AFLPs®
- 5µl Buffer TE o agua MilliQ
- 25µl Buffer de carga para acrilamida

Almacenar a -20°C. Antes de usar denaturar a 70°C por 5 minutos

Buffer de carga (Acrilamida) (10ml)

- 9,4ml Formamida
- 500µl EDTA (0,2M)
- 50mgr Cianol xileno
- 50mgr Azul de Bromofenol

Disolver el Cianol xileno y Azul de Bromofenol en 1ml de agua MilliQ.

ANEXO 3. Primers polimórficos utilizados en *P. acuminata* con su respectivo protocolo PCR.

Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
AG5-5#6	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 57°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	
Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
AG5-5#1	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 57°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	
Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
AG5-7#9	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 57°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	
Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
Ob22	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 56°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	
Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
Ob11	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 55°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	
Primer	Mix PCR	Protocolo amplificación
Ob17	Buffer: 1x	Denaturación inicial: 2 minutos a 96°C
	MgCl ₂ : 2mM	Denaturación: 30 segundos a 95°C
	dNTPs: 370uM	Anillamiento : 30 segundos a 58°C * 35 ciclos
	Primers: (F y R): 0,15 uM	Elongación: 45 segundos a 72°C
	Taq: 1U	Elongación final: 10 minutos a 72°C
	ADN: 5ul	

14. GLOSARIO

Alelo: Forma particular de un gen o locus dado.

Biodiversidad o Diversidad Biológica: Comprende la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otros, los ecosistemas terrestres, marinos y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los que forman parte; incluye la diversidad genética dentro de cada especie, entre especies y de los ecosistemas, como resultado de procesos naturales y culturales.

Deriva Génica: Fuerza micro evolutiva que reparte al azar los alelos dentro una población en cada generación. Su efecto es inversamente proporcional al tamaño de la población. En la deriva génica no se pierde variabilidad genética, sino que la variabilidad existente se reacomoda entre homocigotos y heterocigotos, aumentando la proporción de homocigotos relativamente a lo esperado con un tamaño infinito de la población.

Desequilibrio ligado (Linkage disequilibrium): Es la probabilidad de que dos o más alelos de loci se encuentren juntos y por lo tanto se segreguen contiguos durante la meiosis, es decir que estén ligados y no tengan independencia en la segregación.

Diversidad genética: Es la cantidad de variaciones que se encuentran dentro de un grupo o una población, y estas variaciones son determinadas por varios cálculos basados en diferentes parámetros.

Endogamia: Cruce entre individuos emparentados, es decir cruce entre parentales e hijos.

Equilibrio Hardy – Weinberg: Modelo basado en una población donde los individuos se reproducen sexualmente y al azar (sin selección), y de esta manera las proporciones dentro de la población se puedan predecir en base a la ecuación $p^2 + 2pq + q^2 = 1$.

Estadísticos - *F*: Son un conjunto de cálculos que permiten estimar la estructuración o diferenciación entre individuos y entre grupos de individuos.

Estructura genética: Son las múltiples variaciones genéticas o moleculares presentes en una población o grupo determinado.

Especie Biológica: Las especies son sistemas de poblaciones: el intercambio de genes entre estos sistemas es limitado o impedido por un mecanismo de aislamiento reproductivo o tal vez por la combinación de varios mecanismos (Dobzhansky, 1937).

Flujo Genético: Movimiento e incorporación de alelos del pool genético de una población al de otra distinta, que persista en la progenie de la población recipiente.

Genotipo: Conjunto o parte de la constitución genética de un individuo. Conjunto de los genes existentes en cada uno de los núcleos celulares de los individuos pertenecientes a una determinada especie.

Locus (loci, plural): Zona o región particular dentro de un genoma o de una secuencia de ADN.

Microsatélite: Es una porción de ADN que se encuentra repetida varias veces en secuencias pequeñas denominadas secuencias en tándem. Son usados como marcadores moleculares, ya que al ser secuencias repetidas mutan fácilmente dentro del genoma incrementando su polimorfismo en una población.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Técnica que permite obtener varias copias (amplificaciones) de un fragmento particular de ADN, mediante primers o cebadores específicos y una enzima polimerasa termoestable.

Polimorfismo: Forma distinta de un carácter en una población. Cuando se habla de alelos, ese alelo debe ocurrir en una o varias poblaciones en una frecuencia mayor al 5%.

Primer o iniciador: Secuencia oligonucleotídica necesaria para que la ADN polimerasa inicie la replicación en la reacción de PCR.

Riqueza alélica: Es un estimador de la diversidad genética, el cual está basado en el número promedio de alelos para un locus en particular dentro de una población.

DECLARACIÓN AUTORIZADA

Yo, Zadquiel Vadim Alejandro Rovaina Rivera, C. I. 092617075-4 autor del trabajo de graduación titulado: “Impacto de la degradación de hábitat sobre la diversidad genética de dos poblaciones de *Prestoea acuminata* (Wild.) H. E. Moore en el noroccidente de la Provincia de Pichincha” previa a la obtención del grado académico de LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS en la **Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica de Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley Orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, Febrero del 2014

Sr. Zadquiel Vadim Rovaina Rivera

C.I. 092617075-4

