



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN CIENCIAS FORESTALES

## DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Cedrela odorata* L. EN EL ESTADO DE CHIAPAS

SEYDI PÉREZ GARCÍA

TESÍS

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

La presente tesis titulada: "Diversidad y estructura genética de *Cedrela odorata* L. en el estado de Chiapas" realizada por la alumna: "Seydi Pérez García" bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS  
CIENCIAS FORESTALES

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Javier López Upton

DIRECTOR DE TESIS



Dr. Moisés Cortés Cruz

ASESOR



Dr. J. Jesús Vargas Hernández

ASESOR



Dr. Saúl Espinosa Zaragoza

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre 2019

# DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Cedrela odorata* L. EN EL ESTADO DE CHIAPAS

Seydi Pérez García, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2020

## RESUMEN

Se realizó un análisis de frecuencias alélicas en grupos de árboles (árboles superiores y no superiores) de *Cedrela odorata* L. en la región norte y sur del estado de Chiapas. Además, se evaluó la diversidad y estructura genética en 63 árboles de cedro en tres regiones de Chiapas. Se colectaron folíolos de hojas jóvenes. La extracción de ADN se llevó a cabo por el método de Saghai-Marroof. Se seleccionaron ocho marcadores SSR para el análisis molecular. En los análisis de árboles superiores y no superiores se encontraron 48 alelos totales. La frecuencia de los 10 alelos más comunes ( $\geq 0.4$ ) varió de 0.471 a 0.958, el mayor número de ellos en los grupos de árboles no superiores. La diversidad genética en ambos grupos de árboles fue similar, aunque existen diferencias entre regiones [árboles superiores  $He = 0.718$  (norte) y 0.569 (sur) en comparación con los no superiores  $He = 0.674$  (norte) y 0.553 (sur)]. Los grupos presentaron valores positivos en los índices de fijación ( $F_{is} = 0.359$  y  $F_{it} = 0.418$ ), sugiriendo un efecto de endogamia y deficiencia de heterocigotos. El valor promedio de  $F_{st}$  ( $= 0.091$ ) sugiere que existe diferenciación genética moderada entre los grupos de árboles superiores y los no superiores de las diferentes regiones. El análisis bayesiano identificó tres grupos genéticos de acuerdo a las frecuencias alélicas de los árboles. El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y el dendrograma identificaron dos grupos genéticos, separando las poblaciones de la región norte y sur. Para los estudios de diversidad genética en las tres regiones, fue ligeramente superior en la región norte ( $He = 0.724$ ) en comparación con la región centro ( $He = 0.694$ ) y sur ( $He = 0.615$ ). Los valores de índices de fijación también fueron positivos ( $F_{is} = 0.374$  y  $F_{it} = 0.406$ ). En cuanto a la estructura genética, el valor más alto de  $F_{st}$  fue entre la región norte y sur (0.074), indicando diferenciación genética alta, comparado entre la región norte y centro (0.018). El análisis bayesiano, el PCoA y el dendrograma identificó dos grupos genéticos. El análisis de varianza molecular (AMOVA), sugiere que la mayor variación genética se encuentra dentro de regiones (93.94 %). Los parámetros calculados sugieren que no hay reducción de la diversidad genética al realizar la selección de árboles superiores, al menos para estos marcadores. La región más diversa fue la región norte.

**Palabras clave:** cedro rojo, diferenciación genética, diversidad, heterocigosidad, selección

# DIVERSITY AND GENETIC STRUCTURE OF *Cedrela odorata* L. IN THE STATE OF CHIAPAS

Seydi Pérez García, M. C.  
Colegio de Postgraduados, 2020

## ABSTRACT

An allelic frequency analysis was performed on groups of trees (superior and non-superior trees) of *Cedrela odorata* L. in the northern and southern region of the state of Chiapas. In addition, diversity and genetic structure were evaluated in 63 cedar trees in three regions of Chiapas. Leaflets of young leaves were collected. DNA extraction was carried out by the Saghai-Marooof method. Eight SSR markers were selected for molecular analysis. In the analysis of superior and non-superior trees, 48 total alleles were found. The frequency of the 10 most common alleles ( $\geq 0.4$ ) varied from 0.471 to 0.958, the largest number of them in non-superior trees. The genetic diversity in both groups of trees was similar, although there are differences between regions [superior trees  $He = 0.718$  (north) and 0.569 (south) compared to the non-superior ones  $He = 0.674$  (north) and 0.553 (south)]. The groups presented positive values in the fixation rates ( $F_{is} = 0.359$  and  $F_{it} = 0.418$ ), suggesting an effect of inbreeding and heterozygous deficiency. The average value of  $F_{st}$  ( $= 0.091$ ) suggests that there is moderate genetic differentiation between the superior and non-superior tree groups of the different regions. The Bayesian analysis identified three genetic groups according to the allelic frequencies of the trees. The Principal Coordinate Analysis (PCoA) and the dendrogram identified two genetic groups, separating populations from the northern and southern regions. For studies of genetic diversity in the three regions, it was slightly higher in the northern region ( $He = 0.724$ ) compared to the central region ( $He = 0.694$ ) and south ( $He = 0.615$ ). Fixation index values were also positive ( $F_{is} = 0.374$  and  $F_{it} = 0.406$ ). Regarding the genetic structure, the highest  $F_{st}$  value was between the northern and southern regions (0.074), indicating high genetic differentiation, compared between the northern and central regions (0.018). The Bayesian analysis, the PCoA and the dendrogram identified two genetic groups. The analysis of molecular variance (AMOVA) suggests that the greatest genetic variation is found within regions (93.94%). The calculated parameters suggest that there is no reduction in genetic diversity when selecting higher trees, at least for the markers used. The most diverse region was the northern region.

**Keywords:** diversity, genetic differentiation, heterozygosity, selection, spanish cedar.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres Eray Pérez Bonifas y Mirna García de la Cruz, por el apoyo moral que siempre me han dado.

A mis hermanos Ángel Pérez García, Williams Pérez García y Jenifer Pérez García, por ser una fuente de inspiración en mis estudios.

A mi pareja Ronnie de León Santiago, por siempre estar a mi lado. Apoyándome en cada momento de esta etapa.

A mi director de tesis Moisés Cortés Cruz, por los consejos, comentarios y motivación en cada proceso de investigación. Aparte de ser un gran investigador, una gran persona.

A mi consejero Javier López Upton, por apoyarme en el transcurso de esta maestría, siempre al pendiente del proceso de la investigación, del avance académico que tenía que llevar. También agradecerle por el tiempo para consejos en el área de investigación.

A mi asesor J. Jesús Vargas Hernández, porque siempre estuvo para aclararme las dudas y hacer más fácil mi visión y razonamiento en la investigación.

A mi asesor Saúl Espinosa Zaragoza, por el apoyo y facilidad en la recolecta del material en campo. Además de su confianza y apoyo en el inicio de la maestría. A Hernán Ichimura por su accesibilidad en la recolecta de material en campo.

Al proyecto “Establecimiento de cuatro huertos semilleros asexuales, regionales con el establecimiento y evaluación temprana de 12 ensayos de progenies (tres ensayos por cada huerto) de *Cedrela odorata* L. Conacyt/ Conafor” por apoyar en la recolecta del material vegetal y al proyecto “Fomento y Operación del Subsistema de Recursos Genéticos Forestales dentro del Centro Nacional de Recursos Genéticos” por apoyar en el análisis molecular.

## CONTENIDO

RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE CUADROS .....	viii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN GRUPOS DE ÁRBOLES SUPERIORES Y NO SUPERIORES DE <i>Cedrela odorata</i> L. MEDIANTE MICROSATÉLITES.....	7
RESUMEN .....	7
INTRODUCCIÓN .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS .....	10
Recolecta de material vegetal .....	10
Extracción de ADN .....	11
Cuantificación, pureza e integridad del ADN .....	12
Criba (Selección de marcadores SSR).....	14
Análisis molecular .....	18
RESULTADOS .....	19
Calidad de ADN .....	19
Criba genética.....	20
Diversidad genética .....	22
Estructura genética .....	28
DISCUSIONES .....	33
Diversidad genética .....	33
Estructura genética .....	35
CONCLUSIONES .....	36
CAPÍTULO III. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE <i>Cedrela odorata</i> L. EN EL ESTADO DE CHIAPAS MEDIANTE MICROSATÉLITES.....	37
RESUMEN .....	37

INTRODUCCIÓN .....	38
MATERIALES Y MÉTODOS .....	40
Análisis de datos.....	40
RESULTADOS .....	42
Diversidad genética .....	42
Estructura genética .....	43
DISCUSIONES .....	49
Diversidad genética .....	49
Estructura genética .....	50
CONCLUSIONES .....	52
DISCUSIÓN GENERAL.....	53
Diversidad genética .....	53
Estructura genética .....	54
CONCLUSIONES GENERALES .....	56
LITERATURA CITADA.....	57

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Número de árboles y localización geográfica de los cuatro grupos de <i>Cedrela odorata</i> L. muestreados en el estado de Chiapas. ....	10
<b>Cuadro 2.</b> Buffer de extracción de ADN con el protocolo Saghai-Marroof <i>et al.</i> (1984).....	12
<b>Cuadro 3.</b> Marcadores SSR empleados en la criba genética del análisis de diversidad genética de <i>Cedrela odorata</i> L. en Chiapas. ....	16
<b>Cuadro 4.</b> Características de los marcadores SSR seleccionados para análisis de frecuencias alélicas de 61 individuos de <i>Cedrela odorata</i> L. en el estado de Chiapas.....	23
<b>Cuadro 5.</b> Parámetros de diversidad genética en cuatro grupos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas.....	24
<b>Cuadro 6.</b> Frecuencias alélicas de alelos privados obtenidos en los cuatro grupos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. muestreados en el estado de Chiapas.....	24
<b>Cuadro 7.</b> Estimación promedio de los índices de fijación (estadísticos de Wright) y el número de migrantes ( $Nm$ ) basados en ocho loci polimórficos de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas.....	26
<b>Cuadro 8.</b> Diferenciación genética entre grupos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas.....	29
<b>Cuadro 9.</b> Análisis de varianza molecular y estimador de diferenciación genética de dos grupos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. en dos regiones de Chiapas. ....	29
<b>Cuadro 10.</b> Coeficientes de ancestría ( $Q$ ) estimada para los cuatro grupos fenotípicos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas.....	31
<b>Cuadro 11.</b> Parámetros de diversidad genética de <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas.....	42
<b>Cuadro 12.</b> Estimación promedio de diversidad genética, índices de fijación de Wright (1951) y número de migrantes ( $Nm$ ) basados en ocho loci polimórficos de <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas.....	43
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de varianza molecular y estimador de diferenciación genética de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L., en tres regiones del estado de Chiapas.....	45
<b>Cuadro 14.</b> Coeficientes de ancestría ( $Q$ ) estimada para árboles <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas. ....	47



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Puntos de recolección de las 61 muestras de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas; a) Grupos del norte (27 árboles), con 17 árboles superiores (triángulos rojos) y 10 no superiores (triángulos azules); b) grupos del sur (34 árboles): 17 árboles superiores (triángulos rojos) y 17 no superiores (triángulos azules). ..... 17
- Figura 2.** Verificación de la integridad del ADN extraído de muestras de individuos de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas, mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los carriles indicados con números contienen 10 ng de ADN en cada muestra y 100 ng de Lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA), en el carril de referencia indicado  $\lambda$ . ..... 19
- Figura 3.** Funcionalidad del ADN extraído de muestras de individuos de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas, mediante PCR con el gen RbcL y visualizado en electroforesis en gel de agarosa 2 %. Los carriles indicados con números contienen 3  $\mu$ l de producto para cada muestra, en el primer carril 5  $\mu$ l del marcador (PROMEGA, Madison, WI, USA) de peso molecular de 100 bp..... 20
- Figura 4.** Criba genética inicial para la selección de cebadores en el análisis de diversidad en árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas, en geles de agarosa 2 %. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA) y en los siguientes seis carriles, el producto de PCR de cada muestra, indicada con el número del individuo muestreado. Los colores corresponden a un lugar de recolecta de la muestra. .... 21
- Figura 5.** Criba genética inicial para la selección de cebadores en el análisis de diversidad en árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas en geles de agarosa 2 %. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA) y en los siguientes seis carriles, el producto de PCR de cada muestra, indicada con el número del individuo muestreado..... 21
- Figura 6.** Alelos con mayor frecuencia alélica promedio en cuatro grupos de árboles (AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur) de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas. .... 25
- Figura 7.** Frecuencias alélicas de 48 alelos en ocho loci polimórficos en cuatro grupos (AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur) de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas. .... 27

<b>Figura 8.</b> Variabilidad genética de las dos primeras coordenadas de las distancias genéticas en cuatro grupos de árboles (AS_N: árboles superiores y AnS_N: no superiores del norte; AS_S: árboles superiores y AnS_S: no superiores del sur) de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas. ....	28
<b>Figura 9.</b> Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) entre grupos de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas. (AS_N: árboles superiores del norte; AnS_N: árboles no superiores del norte; AS_S: árboles superiores del sur; AnS_S: árboles no superiores del sur). ....	30
<b>Figura 10.</b> Punto de inflexión para asignación de grupos en $K=3$ , del análisis de estructura de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas por el método Evanno <i>et al.</i> (2005). ....	31
<b>Figura 11.</b> Asignación de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. del estado de Chiapas por grupos genéticos. a) Grupo genético uno; b) Grupo genético dos; c) Grupo genético tres. Eje X: número de árbol y grupo fenotípico al que pertenece; Eje Y: coeficiente de coancestría de cada árbol. ....	32
<b>Figura 12.</b> Puntos de recolección de 63 muestras de <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas. Los triángulos de color verde oscuro indican los árboles muestreados de la región norte; los verde claro de la región centro y los rojos de la región sur. ....	41
<b>Figura 13.</b> Análisis de Coordenadas Principales (PcoA). Representación visual de las dos primeras coordenadas, a partir de las distancias genéticas de Nei (1972). El número 1 representa los árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. de la región norte, el 2 región centro y el 3 de la región sur, del estado de Chiapas. ....	44
<b>Figura 14.</b> Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) para árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas. Las regiones están representadas por el color del triángulo. ....	46
<b>Figura 15.</b> Punto de inflexión para asignación de grupos en $K=2$ , del análisis de estructura de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L. en tres regiones del estado de Chiapas, mediante el método Evanno <i>et al.</i> (2005). ....	47
<b>Figura 16.</b> Asignación de árboles de <i>Cedrela odorata</i> L., en tres regiones del estado de Chiapas por grupos genéticos. a) Grupo genético I; b) Grupo genético II. Eje X: número de árbol y la región a la que pertenece (Reg_N: Región Norte, Reg_C: Región Centro y Reg_S: Región Sur); Eje Y: valor del coeficiente de ancestría de cada árbol. ....	48

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La diversidad genética en poblaciones naturales de diferentes especies forestales ha sido afectada por la fragmentación de hábitat, cambio de uso de suelo por actividades antropogénicas, como los es el establecimiento de cultivo agrícolas o ganadería extensiva y la deforestación excesiva (Cayuela, 2006; Covalada *et al.*, 2016). Lo anterior ha llevado a una reducción del tamaño efectivo de poblaciones, menor riqueza alélica, aumento en el aislamiento de las poblaciones y depresión endogámica (Cavers *et al.*, 2003a; Leshner-Gordillo *et al.*, 2018). Esta situación provoca una disminución de vigor de los individuos y poblaciones, que se refleja en menor supervivencia, crecimiento y reproducción (Picó y Quintana, 2005). Además, se provoca la ampliación demográfica de especies generalista y el descenso de las especialistas, con una pérdida de organismos silvestres que dependen del hábitat (Gurrutxaga y Lozano, 2006). La sobreexplotación de las especies siempre va dirigida a las de mayor demanda y valor económico, incluso con la tala ilegal de la madera (Caballero, 2010 y Ramírez-García *et al.*, 2008). Dentro de ellas, la tala va dirigida a individuos fenotípicamente superiores, quedando los individuos con características inferiores, lo que genera la erosión genética por la selección disgénica en las especies. Actualmente se han realizado proyectos con la finalidad de obtener germoplasmas en cantidad y calidad en bosques y selva, además de ayudar a la conservación *in situ* de los recursos genéticos (Alía *et al.*, 2003; Gutiérrez-Vázquez y Flores-Montaña, 2017).

*Cedrela odorata* L., conocida comúnmente como cedro rojo, es la madera preciosa más preciada junto con *Swietenia macrophylla* King; tiene una demanda alta en la industria mexicana, utilizada para varios artículos, aunque su uso más importante es para fabricación de chapa y madera terciada con destino en diferentes países (Galán *et al.*, 2008; Pennington y Sarukhán, 2005). Su distribución en México en el Pacífico, desde el sur de Sinaloa hasta Guerrero y la Depresión central y Costa de Chiapas, mientras que en el Golfo, desde el sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán (Patiño, 1997; Hernández *et al.*, 2018). Es una especie heliófila que llega a medir de 20 a 35 m de altura y llega a tener un diámetro a la altura del pecho de 1.7 m. Presenta follaje caducifolio, de copa grande, redondeada, robusta y extendida; hojas alternas de 15 a 50 cm, compuestas por 10 a 22 folíolos opuestos o alternos; sus ramas son ascendentes, arqueadas y

gruesas (Salazar *et al.*, 2000). Es un árbol de tronco recto, robusto, a veces con pequeños contrafuertes. La corteza externa es fisurada, con costillas escamosas de color pardo grisáceo o moreno rojizo; la interna es color rosado o pardo amarillento; su grosor es aproximado a los 20 mm (Conabio, 2013). Sus flores son monoicas; las flores masculinas y femeninas aparecen en la misma inflorescencia, pero la especie es proterógina, abriendo las flores femeninas primero (Cintron, 1990). Las inflorescencias se encuentran en panículas terminales largas y sueltas de 15 a 30 cm, angostas tubulares con 5 pétalos, suavemente perfumadas con forma de cáliz de copa, color crema verdoso (Salazar *et al.*, 2000; SIRE, 2012). Sus frutos son infrutescencias de hasta 30 cm de largo, cápsulas leñosas, elipsoides, de color pardo verdoso o moreno con grupos de lenticelas pálidas, con olor a ajo. Cuando el fruto abre libera alrededor de 30 o 50 semillas (Salazar *et al.*, 2000). La semilla es de forma ovoide, comprimidas, planas, provistas de un ala oscura, lisa y fácilmente quebradiza, con la testa de color castaño; presenta un promedio de 94,965 semilla/kg, número que varía dependiendo de los efectos genéticos y ambientales (Espitia-Camacho *et al.*, 2017).

El ciclo reproductivo de *C. odorata* depende del lugar de desarrollo y de las condiciones, pudiendo diagnosticar la etapa fenológica en la que se encuentra y el tiempo que tarda. Los árboles comienzan con la caída de hojas después que los frutos de la temporada anterior ya han madurado, antes de que comience la floración (Mariscal, 2014). El fruto en México se presenta desde el mes de noviembre hasta marzo, en otros países como Costa Rica se presenta desde marzo a abril, el desarrollo tarda de 9 a 10 meses, durante la temporada de sequía. Los árboles comienzan su reproducción a una edad de 10 a 12 años, la viabilidad de la semilla depende de la calidad de ésta, llegando hasta un 90 % (Mariscal, 2014; Rojas, 2013). Esta semilla puede almacenarse a temperaturas bajas hasta por 14 meses, con una capacidad de germinación del 70%, y aunque la semilla no presenta latencia, en algunos casos son sumergidas en agua por 24 h con el fin de eliminar inhibidores y tener un mejor porcentaje de germinación (Barrance *et al.*, 2005; Rivera y Lowy, 2006). La germinación comienza a partir de la primera semana hasta la cuarta, con un porcentaje de 70 a 85 % (Mariscal, 2014; Rivera y Lowy, 2006) y en algunos ensayos de progenie hasta 97 % (Márquez *et al.*, 2005). El desarrollo inicial de las plántulas es rápido siempre y cuando la humedad y la luz sean las óptimas. Las plántulas cultivadas a la sombra se saturan fotosintéticamente a intensidades bajas y son tolerantes a la sombra, pero son

susceptibles a quemarse con el sol y a insectos cuando se mueven de lugar, pero las plántulas cultivadas bajo sol requieren de una intensidad de luz alta para su mejor crecimiento (Cintron, 1990). Otra forma de propagación es mediante enraizamiento de estacas con fitoreguladores enraizantes. Sampayo-Maldonado *et al.* (2016) mencionan tener un mayor prendimiento con la utilización de ácido naftalen-acético (ANA) a una concentración de 400 ppm; en algunos llega a una supervivencia de 75 % con una concentración de 1500 ppm de ácido indol-butírico (AIB), además de una posición apical de la estaca que favorece la supervivencia y enraizamiento. El enraizamiento está ligado a factores como el estado de madurez de la planta. En proyectos de huertos semilleros asexuales su propagación es por medio de injertos; en algunos casos el porcentaje de prendimiento es bajo, debido principalmente a yemas inmaduras usadas en el injerto (Callizaya-Cazarani, 2003). Otra forma de propagación es mediante cultivo *in vitro* de órganos y tejidos para clonación de árboles superiores. En algunos casos se promueve la formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras (Daquinta *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2006); en otros casos se utilizan explantes tiernos de los brotes de estacas enraizadas o de injerto, obteniendo un buen índice de brotación y de enraizado a partir de los explantes (Gómez-Díaz *et al.*, 2007).

Actualmente, por la sobreexplotación de las poblaciones de la especie, ésta se encuentra con protección especial en la NOM-059 (SEMARNAT, 2010) y en la lista roja de la UICN como vulnerable (2013). Considerando que el estado de Chiapas ha sufrido deforestación de hábitat (Covaleda *et al.*, 2016), se desconoce el estado genético de la especie actualmente. Los marcadores moleculares son una alternativa, para ayudar a plantear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos (Becerra y Paredes, 2000; Oliveira *et al.*, 2006).

En el área forestal, los marcadores moleculares ayudan a definir prácticas de manejo adecuadas para la especie dependiendo de su variabilidad genética. Por ejemplo, se pueden establecer practicas silviculturales para prevenir la erosión de la diversidad genética de la población y promover el flujo de genes (De la Torre, 2013), para reducir la susceptibilidad a enfermedades o factores bióticos o abióticos y a cambio ambientales. Los marcadores ayudan a identificar variantes alélicas únicas que pueden representar un reservorio de diversidad genética para la especie en términos de adaptación local y un amortiguador a futuro (Alfonso-Corrado *et*

*al.*, 2014); además, son importantes en la selección y monitoreo de programas de mejoramiento genético, por lo que es importante generar técnicas de extracción de ADN genómico (Teza *et al.*, 2012).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares que se han utilizado a lo largo de la historia. Algunos de ellos incluyen a los RFLP's (Fragmentos de Restricción Polimórficos), que permiten estudiar ampliamente el genoma, tanto en secuencias codificantes y no codificantes, y detectar con mayor precisión cambios genéticos puntuales, pero esta técnica es muy laboriosa, lenta y cara. Otra técnica son los RAPD's (Fragmentos polimórficos de ADN Amplificados al Azar), que utiliza iniciadores aleatorios de 10 pares de bases para la amplificación del ADN y se basa en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), son de herencia dominante y puede detectar regiones de ADN altamente variable. Se utiliza en mapeo genético, identificación de razas, variación genética de poblaciones emparentadas, entre otras. Pero la desventaja es que los resultados pueden ser variables dependiendo de las condiciones del laboratorio, siendo inconsistente en los datos; Los AFLP's (Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados) son marcadores dominantes, se encuentran en todo el genoma y pueden identificar fragmentos ligados a genes de interés comercial. Estos marcadores requieren ADN de alta calidad para el proceso de amplificación.; Los microsatélites (SSR) son repeticiones cortas en tándem de 1 a 6 pares de bases de nucleótidos. Son de gran importancia por sus ventajas, como su codominancia, multialelismo y nivel elevado de heterocigosidad. No requieren mucha cantidad de ADN, tampoco que sea de buena calidad para su amplificación. Son utilizados en estudios de diversidad genética, permiten discriminación precisa de individuos emparentados (Araya *et al.*, 2005; Becerra y Paredes, 2000; González, 2003).

Se han realizado algunos análisis moleculares en el género *Cedrela*, como el estudio de transferibilidad de 194 marcadores SSR para 4 especies de *Cedrela* con el objetivo de tener mayores herramientas de monitoreo genético a consecuencia de la sobre explotación en bosques subtropicales en Argentina (Soldati *et al.*, 2014). Gandara *et al.* (2014) desarrollaron y caracterizaron marcadores microsatelites para *C. fissilis*, considerada en peligro de extinción por fragmentación de bosques. Todos los marcadores fueron polimórficos presentando una moderada diversidad genética y diferenciación genética significativamente alta en las poblaciones. Cavers *et al.* (2003a) realizaron una combinación de marcadores AFLP y de cloroplasto, que permitió

evaluar el nivel y distribución de diversidad genética de *C. odorata* en Costa Rica e identificar poblaciones con dos ecotipos (húmedo-seco) en función de las preferencias de hábitat. Las poblaciones de ecotipos secos presentaron nivel mayor de diversidad; la diversidad a nivel de cloroplasto presentó una profunda diferenciación. Cavers *et al.* (2003b) interpretaron la historia de colonización de *C. odorata* en Mesoamérica a través del genoma del cloroplasto (cpDNA), con muestras de 29 poblaciones de seis países, concluyendo que los marcadores tipo cpDNA son óptimos para el estudio de los patrones históricos de dispersión y colonización, además de encontrar patrones de fragmentación después de la última glaciación, por lo que se infirió la estructura filogeográfica de la especie en Mesoamérica. Cavers *et al.* (2013) realizaron otro estudio filogenético de *Cedreia* en el Neotrópico, con ayuda del espaciador transcrito interno (ITS) de las regiones 18S y 26S flanqueantes, además de utilizar microsatélites nucleares y de cloroplasto. Encontrando con ayuda de los ITS cuatro especies morfológicamente crípticas dentro de *C. odorata*. Con los microsatélites se observó un flujo limitado de genes, ocasionado por barrera de mar y montañas. Soldati *et al.* (2013), analizaron con marcadores SSR y AFLP los patrones de distribución de la diversidad de *C. odorata*, encontrando mayor diversidad en los loci SSR que en AFLP, pero con los dos tipos de marcadores se concluyó que no hay diferenciación genética por un flujo de genes debido al tamaño limitado de su distribución, pero fue posible identificar cuatro poblaciones prioritarias para conservación. Mariscal (2014) analizó la variabilidad molecular en individuos de *C. odorata* utilizados en ensayos de progenie, procedentes de Veracruz, Oaxaca, Tabasco, Campeche y el sur de Chiapas, utilizando cinco marcadores SSR, de los cuales sólo tres fueron polimórficos; en ese estudio se encontró cierto grado de endogamia y un moderado grado de diferenciación genética, con una diversidad genética baja. Aguirre (2017) analizó patrones de distribución y estructura genética de *C. odorata* en poblaciones de Colombia con SSR, obteniendo una diferenciación genética baja, debido al sistemas de polinización de la especie, aunque presentó alta diversidad genética, por lo que recomendó estrategias de manejo para mantenerla. Leshner-Gordillo *et al.* (2018) analizaron la diversidad genética de *C. odorata* con diez marcadores SSR en el estado de Tabasco, obteniendo alta diferenciación pero baja diversidad genética dentro de poblaciones, lo que indica una mayor erosión genética en la actualidad. Paredes *et al.* (2019) evaluaron las diferencias genéticas de *C. odorata* en sitios de Bolivia con ocho marcadores SSR, encontrando alta diversidad genética,

pero los índices de fijación fueron positivos, sugiriendo un efecto de endogamia; los resultados mostraron estructura genética, pero no coincidieron con los subgrupos que se distinguieron en el muestreo.

De la Torre (2013) evaluó la diferenciación genética dentro y entre poblaciones del neotropico con marcadores AFLP, encontrando altos niveles de diversidad genética, con diferencias genéticas debido al aislamiento por distancia geográfica. Kremer *et al.* (2005) analizó la diversidad genética con AFLP en especies tropicales, entre ellas *Cedrela odorata* L., en función de la frecuencia de homocigotos nulos e índice de fijación. Navarro *et al.* (2002) evaluaron la diversidad genética y diferenciación con marcadores RAPD y rasgos cuantitativos en poblaciones de varios países de Mesoamérica, presentando una correlación positiva entre ellos, por lo que el grado de divergencia en los marcadores moleculares se puede usar para predecir el grado de diferenciación poblacional en rasgos cuantitativos. Tijerino-López (2008) determinó la variabilidad genética de cinco poblaciones utilizando la técnica RAPD en Nicaragua, encontrando mayor diversidad genética dentro de poblaciones que entre poblaciones. También se han realizado estudios de mejoramiento genético, como la construcción de vectores para la transformación de cloroplastos que permitan en un futuro la introducción de genes que den resistencia al insecto barrenador de brotes *Hypsipyla grandella* Zeller. El vector de transformación plasmídica para cedro tiene como secuencia flanqueante de recombinación la región 16S-trnI y trnA-23S (Apolinar, 2011).

Como parte de la contribución al estudio de la diversidad y estructura genética en la especie, en el presente estudio se evaluaron y seleccionaron los marcadores microsatelites polimórficos para el análisis molecular de *Cedrela odorata* L. Se estimaron las frecuencias alélicas y diferenciación genética en grupos de árboles superiores y no superiores de *Cedrela odorata* en dos regiones del estado de Chiapas con el objetivo de evaluar el efecto de la selección de árboles con fines de mejoramiento genético sobre la diversidad genética, con respecto al grupo de árboles no seleccionados. Además, se evaluó la diversidad y estructura genética de poblaciones naturales de *Cedrela odorata* en tres regiones del estado de Chiapas.



## CAPÍTULO II. ANÁLISIS DE FRECUENCIAS ALÉLICAS EN GRUPOS DE ÁRBOLES SUPERIORES Y NO SUPERIORES DE *Cedrela odorata* L. MEDIANTE MICROSATÉLITES

### RESUMEN

El cambio de uso de suelo y la selección disgénica han ocasionado una degradación forestal y fragmentación de hábitat, produciendo una pérdida de diversidad genética forestal y disminución del vigor de individuos, afectando negativamente la supervivencia, crecimiento y reproducción. En este estudio se evaluó la riqueza alélica en grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. fenotípicamente superiores, en comparación con árboles no superiores en el norte y sur de Chiapas. Para determinar la riqueza alélica se emplearon ocho marcadores microsatélites específicos para cedro. El número total de alelos fue 48, con tres alelos privados para el grupo de árboles superiores en la región norte. La frecuencia de los 10 alelos más comunes ( $\geq 0.4$ ) varió de 0.471 a 0.958, el mayor número de ellos en los grupos de árboles no superiores. La diversidad genética en ambos grupos de árboles fue similar, aunque existen diferencias entre regiones [árboles superiores  $He = 0.718$  (norte) y  $0.569$  (sur) en comparación con los no superiores  $He = 0.674$  (norte) y  $0.553$  (sur)]. Los grupos presentaron valores positivos en los índices de fijación ( $F_{is} = 0.359$  y  $F_{it} = 0.418$ ), sugiriendo un efecto de endogamia y deficiencia de heterocigotos. El valor promedio de  $F_{st}$  de 0.091 sugiere que existe diferenciación genética moderada entre los grupos de árboles superiores y los no superiores de las diferentes regiones. El análisis bayesiano identificó tres grupos genéticos de acuerdo a las frecuencias alélicas de los árboles. El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y el dendrograma identificaron dos grupos genéticos, separando las poblaciones de la región norte y sur. Los parámetros de diversidad calculados sugieren que no hay reducción de la diversidad genética al realizar la selección de árboles superiores, al menos para los marcadores utilizados.

## INTRODUCCIÓN

La selección y cambio de uso de suelo por actividades antropogénicas, como lo son el establecimiento de cultivo agrícolas, ganadería extensiva, deforestación excesiva y selección disgénica, han ocasionado una degradación forestal y fragmentación de hábitat (Aravanopoulos, 2018; Cayuela, 2006; Covalada *et al.*, 2016). Lo anterior ha llevado a una reducción del tamaño efectivo de poblaciones, menor riqueza alélica, aumento en el aislamiento de las poblaciones y depresión endogámica (Cavers *et al.*, 2003; Leshner-Gordillo *et al.*, 2018). Estos factores afectan negativamente el vigor de los individuos y poblaciones, reflejado en una menor supervivencia, crecimiento y reproducción (Gurrutxaga y Lozano, 2006; Picó y Quintana-Ascencio, 2005), propiciando graves problemas de adaptación de especies forestales por su largo ciclo de vida, en comparación con otras plantas (Eguiarte *et al.*, 2013). La sobreexplotación de las especies siempre va dirigida a las de mayor demanda y valor económico, incluso con la tala ilegal de la madera (Caballero, 2010 y Ramírez-García *et al.*, 2008). Igualmente, la tala va dirigida a árboles fenotípicamente superiores, quedando los árboles con características inferiores, lo que genera erosión genética por la selección disgénica en las especies.

*Cedrela odorata* L, conocida comúnmente como cedro rojo, tiene una demanda alta en la industria mexicana por su apreciada madera, que es utilizada para la fabricación de varios artículos de alto valor, aunque su uso más importante es para la fabricación de chapa y madera terciada (Galán *et al.*, 2008). Actualmente, por la sobreexplotación de sus poblaciones naturales, se encuentra con protección especial bajo la NOM-059 (SEMARNAT, 2010) y en la lista roja de la UICN (2013) como especie vulnerable.

Los proyectos de selección de árboles superiores para programas de mejoramiento genético forestal pretenden generar germoplasma de calidad y en cantidad suficiente, reteniendo la diversidad genética y el potencial adaptativo al mismo tiempo (Loo, 2004). Además, buscan mejorar la capacidad reproductiva de las principales especies y rescatar genotipos valiosos de baja frecuencias en los bosques (Gutiérrez, 2003). Aunque existen estas premisas, no hay estudios que evalúen los niveles de diversidad genética de árboles seleccionados fenotípicamente superiores en campo contra árboles no superiores o bien descartados por tener características fenotípicas no adecuadas a la industria de la madera.

Los marcadores moleculares son una alternativa para evaluar diversidad genética y plantear estrategias de aprovechamiento y conservación de poblaciones, especies y recursos genéticos (Becerra y Paredes, 2000; Oliveira *et al.*, 2006). Uno de los marcadores empleados comúnmente para este tipo de análisis, son los microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés, Simple Sequence Repeats). Los microsatélites presentan ventajas sobre otros sistemas, como su codominancia, multialelismo y su alta detección de heterocigosidad en varias especies, además de que no requieren una cantidad elevada de ADN de alta calidad (pureza), como otros marcadores. Su alto nivel de polimorfismos permite una discriminación precisa entre individuos emparentados. Sus principales desventajas son que requieren de largo tiempo para su desarrollo y de un presupuesto alto para su diseño, además de que son específicos a la especie (Becerra y Paredes, 2000; González, 2003). Este tipo de marcadores ha sido ampliamente empleado en estudios de diversidad genética (Soldati *et al.*, 2013), flujo de genes entre poblaciones (Cavers *et al.*, 2013), cartografía de características cuantitativas (Becerra y Paredes, 2000) y seguimiento de especies en peligro de extinción (Gandara *et al.*, 2014).

El estado de Chiapas ha sufrido una considerable pérdida de hábitat forestal (Covaleda *et al.*, 2016). Aunque se han iniciado proyectos de mejoramiento genético con el propósito de apoyar los programas de reforestación y restauración ecológica, se desconoce el efecto de la selección fenotípica en la base genética de las especies de mayor valor para estos programas, como el cedro rojo. El objetivo del estudio fue evaluar el estatus de las frecuencias alélicas de árboles seleccionados fenotípicamente superiores para ensayos de procedencias, en comparación con los valores presentes en árboles no superiores (por sus defectos de forma o mal crecimiento), en dos regiones del estado de Chiapas que están aisladas entre sí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolecta de material vegetal

La recolecta del material vegetal se realizó en 2017, en 61 árboles en dos grupos de árboles y en dos regiones en el estado de Chiapas; 34 de ellos fueron superiores (AS), de los cuales 17 son de la parte norte y 17 de la parte sur del estado, y 27 árboles no superiores para mejoramiento genético (AnS), de los cuales 10 son del norte y 17 del sur (Cuadro 1, Figura 1). Las características usadas como criterios de selección en los árboles superiores fueron rectitud del fuste, tamaño (vigor), no bifurcaciones, fuste cilíndrico, ramas (pocas y delgadas), y ausencia de plagas.

**Cuadro 1.** Número de árboles y localización geográfica de los cuatro grupos de *Cedrela odorata* L. muestreados en el estado de Chiapas.

	<b>Población</b>	<b>Árboles</b>	<b>Altitud</b>	<b>Latitud N</b>	<b>Longitud O</b>
Norte	AS <sup>1</sup>	17	48	17° 38' 43.46"	92° 10' 29.53"
	AnS	10	221	17° 22' 19.21"	91° 48' 12.87"
Sur	AS	17	33	15° 42' 37.08"	93° 16' 42.71"
	AnS	17	23	15° 03' 54.54"	92° 31' 28.29"

<sup>1</sup>AS=árboles superiores; AnS= árboles no superiores. Datos del punto central.

Para obtener el ADN se recolectaron folíolos de hojas jóvenes. Las muestras se mantuvieron en fresco, con sus respectivas etiquetas y fueron enviadas al Laboratorio de ADN y Genómica, en el Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG) del INIFAP, en Tepatitlán, Jalisco y almacenadas a -80 °C. Posteriormente se liofilizaron con una presión de vacío de 0.35 Bar y una temperatura de -85 °C durante una semana. Una vez liofilizado el tejido foliar, se pulverizó empleando el equipo Tissue Lyser II (Qiagen, Hilden, Germany), y posteriormente se extrajo el ADN genómico total.

## **Extracción de ADN**

La extracción de ADN para *Cedrela odorata* L. se llevó a cabo por el método de Saghai-Marooif *et al.* (1984) con la adición del 1% de PVP (Polivinilpirrolidona) para la obtención de ADN genómico de alto peso molecular. El procedimiento de extracción se describe a continuación: se agregaron 1000 µl del buffer de extracción (Cuadro 2) previamente calentado (65 °C) a los tubos con el tejido liofilizado, se realizó inversión manual de 5 minutos hasta tener una mezcla homogénea de las muestras. Estas se colocaron en un horno a 65 °C en agitación constante por 45 minutos.

Transcurrido ese tiempo, las muestras se retiraron del horno y se dejaron enfriar durante 5 minutos aproximadamente a temperatura ambiente (TA). Se adicionaron 500 µl de cloroformo/isoamil alcohol (24:1) moviendo suavemente los tubos por inversión durante 10 min a TA. Luego, se colocaron los tubos en agitador por 10 min a TA y después inmediatamente en una centrifuga por 10 min a 14000 rpm a TA.

La fase superior acuosa dentro del tubo se decantó en un tubo nuevo de 2 mL y se repitió el mismo procedimiento de lavado. Después de la segunda centrifugación, la fase superior fue transferida a un tubo nuevo de 1.5 mL que contenía 30 µl de RNasa (10 mg/mL) por medio de una pipeta, teniendo especial cuidado de no absorber la interfase. Nuevamente las muestras se mezclaron por inversión diez veces y se dejaron incubar por 30 minutos a 37 °C.

Para la precipitación del ADN, pasado 30 min se agregó 800 µl de Isopropanol (-20 °C) a todas las muestras, se taparon herméticamente y se realizó la inversión manual diez veces a cada tubo (formación de la hebra de ADN), después se centrifugaron por 10 min a 4500 rpm a TA. Se decantó el Isopropanol, quedando solamente la pastilla en los tubos. Luego, se realizaron dos lavados, el primero con 1000 µl de etanol al 75 % durante 5 min, desprendiendo la pastilla del fondo del tubo para hacer más eficiente el lavado, posteriormente se centrifugó a 4500 rpm por 10 min y se decantó el etanol; el segundo lavado se realizó agregando 1000 µl de etanol absoluto con el mismo procedimiento. Se dejó secar la pastilla de ADN hasta la evaporación del etanol. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 100 µl de TE (1 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M EDTA pH 8.0).

## Cuantificación, pureza e integridad del ADN

La concentración y pureza de las muestras de ADN se determinaron por espectrofotometría (NanoDrop, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), con longitudes de onda de 260/280 nm. La integridad del ADN se evaluó en geles de agarosa al 1% y se comparó el patrón de migración de las bandas con marcador lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA). Finalmente, la funcionalidad de las muestras de ADN fue evaluada por medio de la amplificación del marcador molecular RbcL (gen de la subunidad grande de la ribulosa difosfato carboxilasa) que se encuentra en las plantas como fijador de carbono en la fotosíntesis de las plantas (Muñoz-Muga *et al.*, 2018).

**Cuadro 2.** Buffer de extracción de ADN con el protocolo Saghai-Marroof *et al.* (1984).

Concentración Inicial	Concentración Final	1 RXN
ddH <sub>2</sub> O		650 µl
1 M Tris-HCL 7.5	100 Mm	100 µl
5 M NaCl	700 Mm	140 µl
0.5 M EDTA-8.0	50 mM	100 µl
CTAB2	1%	10 mg
14 M BME	140 mm	10 µl
PVP	1%	10 mg
Vol. final		1000 µl

Tris-HCl (Hidroximetil amino metano con ácido clorhídrico), NaCl (Cloruro de sodio), EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético), CTAB (Hexadecil trimetil bromuro de amonio), BME ( $\beta$ -mercaptoetanol), PVP (Polivinilpirrolidona) y dH<sub>2</sub>O (agua).

Para la primera evaluación se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 2000® Thermo Scientific, el cual permitió obtener a partir de 1 µl de muestra de ADN (ng/µl) la calidad por medio del rango de absorbancia A<sub>260/280</sub>. Se tomó como buena calidad los valores resultantes de A<sub>260/280</sub> entre 1.8 a 2.0, para tener la certeza de que no quedaron restos celulares o residuos de soluciones empleadas en la extracción. De acuerdo a cada concentración por muestra se ajustaron a una concentración de 10 ng/µl y se conservaron a una temperatura de 4°C.

En la segunda evaluación la cantidad e integridad del ADN se verificó visualmente mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con la solución GelRed™ 0.001X, donde se cargó por pozo una muestra 5 µl de ADN genómico y 3 µl de SGB (Sample Gel Buffer) el cual se corrió en un buffer TBE (Solución de trizma base, ácido bórico y EDTA) 1X por 50 minutos a 70 volts, con una referencia de marcador lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA) y se visualizó con luz ultravioleta en un fotodocumentador.

Para comprobar la ausencia de los contaminantes y medir el rendimiento del ADN se utilizó la técnica de PCR. Ésta se desarrolla en tres pasos principales: desnaturalización, es la etapa donde la doble cadena de ADN es calentada y separada a una temperatura de 95 °C durante 20 a 30 segundos, estas servirán como templado para la siguiente etapa; Hibridación, en la cual los primers se alinean al extremo 3' del templado, el cual fue separado inicialmente e hibridan con su secuencia complementaria, es importante que la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) sea la indicada para evitar dímeros, dando especificidad y complejo eficiente; generalmente se encuentra entre 50 a 60 °C. Finalmente, la extensión, en la cual la Taq polimerasa actúa en el templado-primer y comienza la función catalítica agregando dNTP's a una gran velocidad para generar la nueva cadena complementaria de ADN; la temperatura óptima para la reacción es a 72 °C para que la enzima sea funcional. La PCR inicia normalmente de 30 a 35 ciclos para aumentar el número de copias de la secuencia de ADN blanco (Tamay *et al.*, 2013).

La reacción se realizó en un volumen final de 5 µL, con 2X de Taq polimerasa (RedTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, SIGMA-ALDRICH), 10 µM de cada iniciador y 20 ng de DNA y H<sub>2</sub>O bidestilada, hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de amplificación fueron: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 40 segundos, un paso de alineamiento a 55 °C durante 40 segundos y un paso de extensión a 72 °C durante un minuto, para terminar con un paso de extensión final a 72 °C por 10 minutos. El producto se visualizó por medio de electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 1%, con marcador (PROMEGA, Madison, WI, USA) de peso molecular de 100 bp.

## **Criba (Selección de marcadores SSR)**

Para la selección de los marcadores microsatelites se realizó una criba con 9 marcadores generados para *Cedrela odorata* (Hernández *et al.*, 2008) y 10 marcadores generados para *Swietenia macrophylla* King (Lemes *et al.*, 2002), con el objetivo de visualizar su adaptación y polimorfismo en las muestras de cedro (Cuadro 3). Se utilizaron solo seis muestras de ADN para los 19 marcadores, por causas de tiempo y de reactivos.

La reacción de la PCR para los 19 marcadores se realizó en un volumen final de 10  $\mu$ L, con una concentración final de 0.8X de Taq polimerasa (RedTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 0.4  $\mu$ M de cada iniciador (Forward y Reverse) (SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA), 20 ng de DNA y H<sub>2</sub>O bidestilada, hasta alcanzar el volumen final. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: un paso inicial de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 40 s, un paso de alineamiento a la temperatura 55 °C durante 40 s y un paso de extensión a 72 °C durante 40 s, seguido de un paso de extensión final a 72 °C por 5 minutos.

El producto se visualizó por medio de electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 % a una alimentación de energía de 100 V por 40 minutos y por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida 8 %, a un voltaje constante 250 V durante 2 h. Cada pocillo fue cargado con 3  $\mu$ L de producto y se utilizó un marcador de peso molecular de 20 y 100 bp (PROMEGA, Madison, WI, USA). Los geles fueron teñidos con nitrato de plata, de acuerdo con la metodología reportada por Sanguinetti *et al.* (1994). Las imágenes de los geles fueron visualizadas y documentadas con el fotodocumentador KODAK Gel Logic 112 (Kodak, Rochester, NY, USA).

Se evaluaron gradientes de temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de 50 a 62 °C para cuatro marcadores no amplificados, con dos muestras por marcador y por  $T_m$ . En la preparación de la reacción para la PCR se modificó la concentración final de Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) a 2.5 mM con la finalidad de ayudar a la Taq polimerasa a pegar los dinucleotidos con más eficiencia en la PCR. El volumen final se llevó a 10  $\mu$ L, con 2X de Taq polimerasa (RedTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, SIGMA-ALDRICH), 10  $\mu$ M de cada iniciador (Forward y Reverse), 50 mM de MgCl<sub>2</sub> y 20 ng de ADN y H<sub>2</sub>O bidestilada, hasta alcanzar el volumen final.



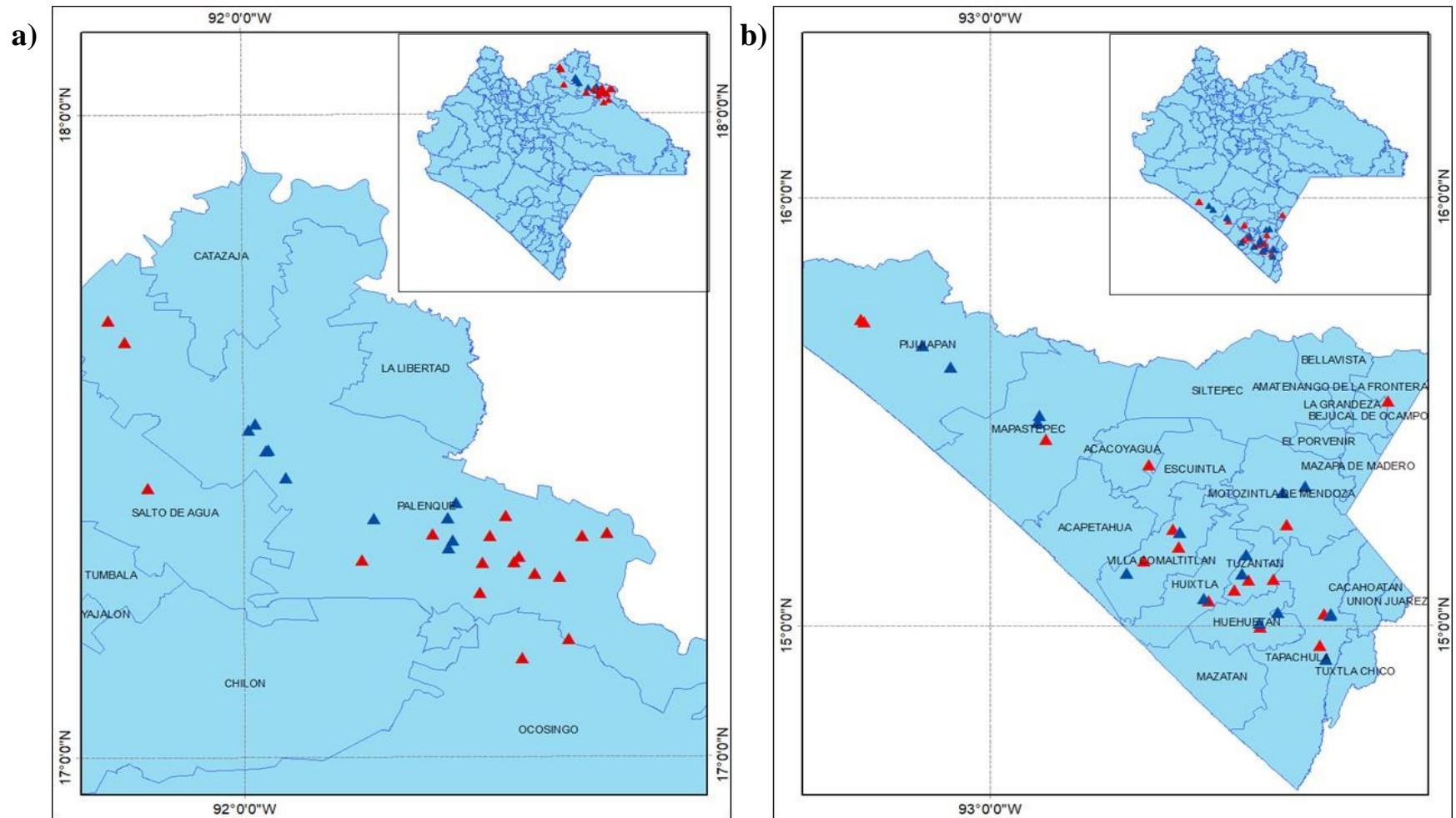
El producto (3  $\mu$ L) se cargó y visualizo en gel de agarosa al 3.5 %, con una alimentación de energía de 80 VOLTS por 1.50 h con una referencia de marcador de 100 bp.

Se realizó una PCR con Tm de 48°C y una a 50°C para los 10 marcadores de *S. macrophylla* para observar cuál era la mejor Tm para la amplificación del producto, además se aumentó la concentración final de Cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) a 3.5 mM.

Finalmente se seleccionaron ocho marcadores SSR de los 19, con base en su polimorfismo, facilidad de amplificación y lectura de los amplicones. Se determinaron los tamaños de los fragmentos, se realizó una matriz de base de datos codominantes en un archivo de Excel Microsoft Office.

**Cuadro 3.** Marcadores SSR empleados en la criba genética del análisis de diversidad genética de *Cedrela odorata* L. en Chiapas.

Locus SSR	Motivo	Secuencias de marcadores (5' – 3')	Tamaño esperado del producto (bp)	T <sub>m</sub> (°C)	Número de accesión de GenBank
Ced02	(GA)20	F:TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R:AACTTTCGAATTGGTTAAGG	130-170	55	EF413962
Ced18	(GA)23	F:CAAAGACCAAGATTTGATGC R:ACTATGGGTGGCACAACACTAC	130-150	52	EF413963
Ced41	(TC)18	F:TCATTCTTGGATCCTGCTAT R:GTGGGAAAGATTGTGAAGAA	120-160	52	EF413964
Ced44	(TG)14(AG)17	F:ACTCCATTAAGTCCATGAA R:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC	180-240	55	EF413965
Ced54	(GA)15(AG)6 (GA)5	F:GATCTCACCCACTTGAAAAA R:GCTCATATTTGAGAGGCATT	120-160	55	EF413966
Ced61a	(TG)10	F:CAATCAAACCAAAAATGGAT R:GCAAATTAACCAGAAAAACG	240-270	55	EF413967
Ced65	(GA)7(CA)14	F:GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R:GAGGTTCGATCAGGTCTTGG	160-200	55	EF413968
Ced95	(CT)17(AC)13	F:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC R:TTATCATCTCCCTCACTCCA	190-250	55	EF413969
Ced131	(CT)16	F:CTCGTAATAATCCCATTCCA R:GGAGATATTTTGGGGTTTT	80-120	55	EF413970
sm01	(AG) 19	F:GCGCGATTGATTGACTTC R:GCGCTTAGCATTATTCTCC	261–295	48	AF428115
sm22	(AG) 18	F:TCTGCTACAGAGCTGGATGC R:GTATGCTCGAAGAAGTCGTTG	119-161	50	AF428116
sm31	(AG) 31	F:CTTCTAATGTTCTGATGCCTG R:AGCAACTCGTGAGGAATTTAC	80-138	48	AF428117
sm32	(AG) 20	F:CACCTTATGTACACACACACAG R:GAAGGAGACACCAGCAATC	146–184	50	AF428118
sm34	(AG) 19	F:GCACTCAAGGTACACTATGAT R:TACGTGTGAATGCGTCTAT	40–96	48	AF428119
sm40	(AG) 19	F:TGCTACTGTCAAGAGTGTAT R:GACAAACATGTACCACAAG	120–146	50	AF428120
sm45	(AG) 21	F:CCTTATGTTCAACACACAGTA R:GAGACACCAGCAATCCAG	140–178	50	AF428121
sm46	(AG) 20	F:GCAGTACTCGCCTATCTTCA R:TGAGAAGTGCAGAATCCTTT	190–226	48	AF428122
sm47	(AG) 24	F:GCCATTGGTCTCAATCTTAC R:GGAAGAGTCTTAGAACACAG	114-150	48	AF428123 16
sm51	(AG) 22	F:GCAATTTCCAGAAGAAACC R:CTGTAGGCGATAACAATCAG	138–182	50	AF428124



**Figura 1.** Puntos de recolección de las 61 muestras de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas; a) Grupos del norte (27 árboles), con 17 árboles superiores (triángulos rojos) y 10 no superiores (triángulos azules); b) grupos del sur (34 árboles): 17 árboles superiores (triángulos rojos) y 17 no superiores (triángulos azules).

## Análisis molecular

Los parámetros de diversidad genética calculados fueron porcentaje de loci polimórficos ( $%P$ ), número promedio de alelos por locus ( $N_a$ ), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y los índices de Wright (1951). Además, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para los cuatro grupos evaluados, con el propósito de observar la distribución de los árboles de cada grupo de acuerdo con las distancias genéticas de Nei. Todos los análisis fueron realizados con el software GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse 2012).

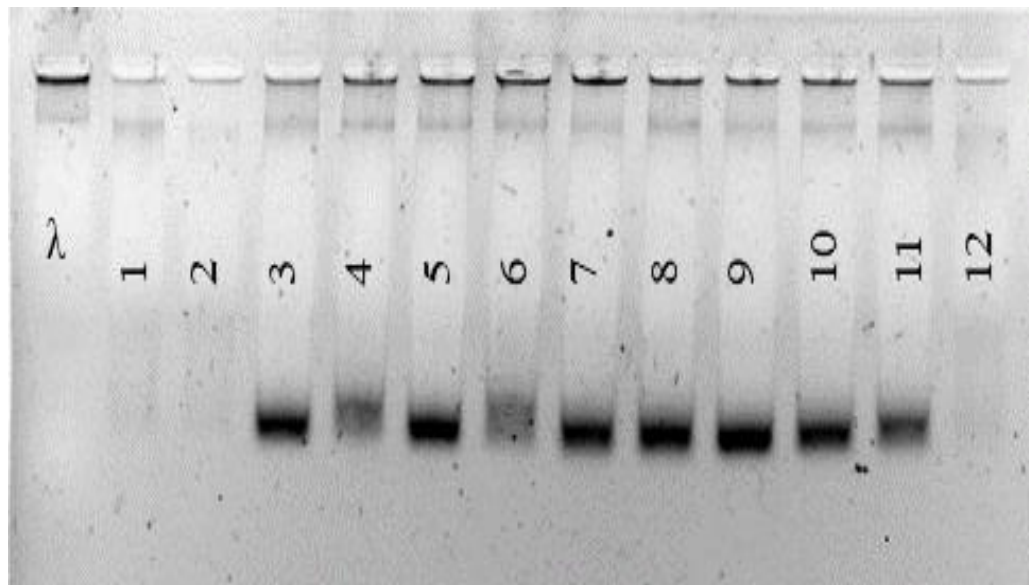
Para determinar la variación genética existente dentro y entre regiones y a nivel de grupos AS y AnS, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el programa Arlequin ver. 3.5 (Escoffier y Lischer, 2010). Con la matriz de distancias genéticas de los cuatro grupos, se generó un dendrograma (Nei, 1972) por el método de neighbor-joining, en el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

La estructura genética de los cuatro grupos se determinó con el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Se utilizó un enfoque sistemático de agrupamiento bayesiano de los árboles, aplicando el método de Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC). El proceso MCMC se inició asignando aleatoriamente árboles a un número determinado de grupos  $K = 1$  hasta  $K = 9$ . Los árboles se fueron asignando a cada grupo genético, con base en las estimaciones de frecuencia. Para este proceso se realizaron 10 réplicas independientes, cada una con 200,000 pasos de MCMC, tras analizarlos 100,000 veces, presentando un modelo de ancestría de mezcla (asumiendo que los árboles pueden tener un origen mixto) y frecuencias alélicas correlacionadas. El valor más probable de  $K$  fue determinado usando el método de Evanno *et al.* (2005) con el programa STRUCTURE HARVESTER en línea ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)).

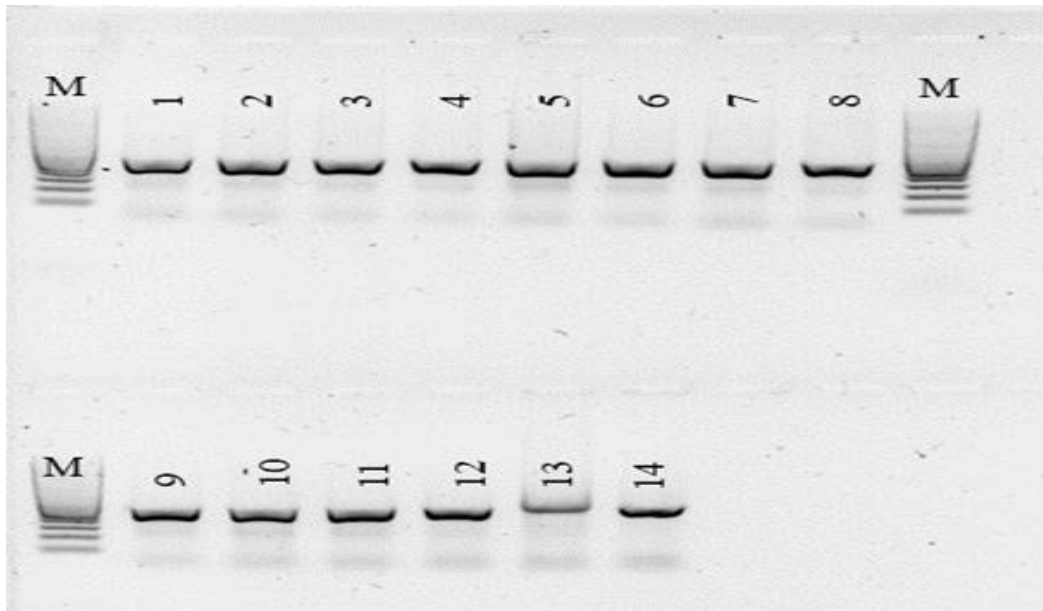
## RESULTADOS

### Calidad de ADN

La calidad y concentración de los individuos de *C. odorata* fueron verificadas para seguir con el análisis molecular. Las concentraciones variaron desde 40 ng/  $\mu$ l hasta 1000 ng/  $\mu$ l. Los resultados de calidad de ADN no fueron buenos en todas las muestras con relación a los indicadores de absorbancia 260/280. La verificación de ADN se realizó en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 % mostrando bandas discretas, en algunos casos con arrastre de contaminantes (Figura 2), por lo que se llevó a cabo el análisis de funcionalidad de ADN con una PCR del gen RBCL para corroborar que el ADN no tuviera inhibidores por fenoles y lograra su amplificación (Figura 3).



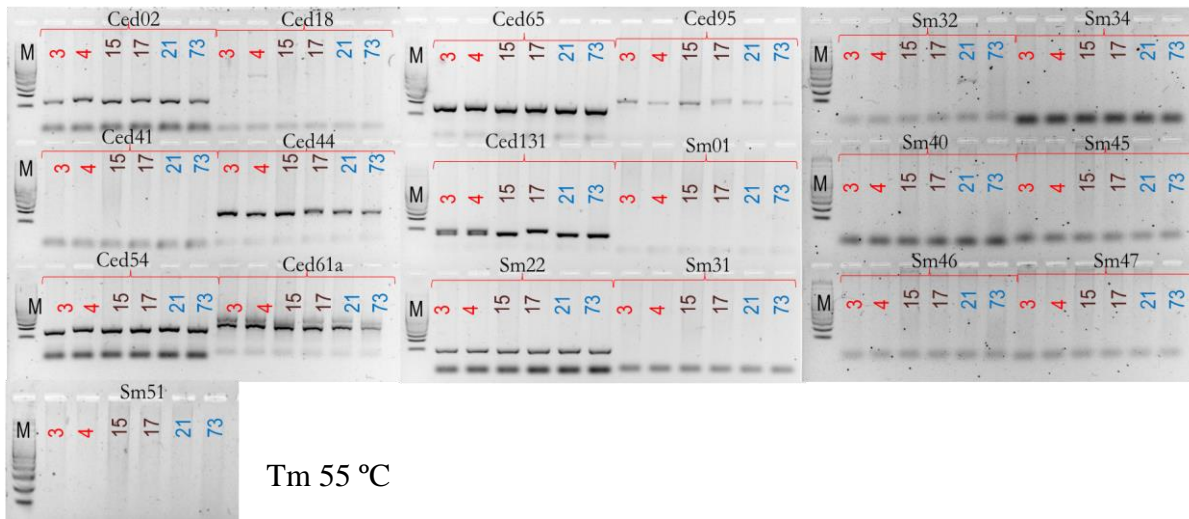
**Figura 2.** Verificación de la integridad del ADN extraído de muestras de individuos de *Cedrele odorata* L. del estado de Chiapas, mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. Los carriles indicados con números contienen 10 ng de ADN en cada muestra y 100 ng de Lambda sin cortar (PROMEGA, Madison, WI, USA), en el carril de referencia indicado  $\lambda$ .



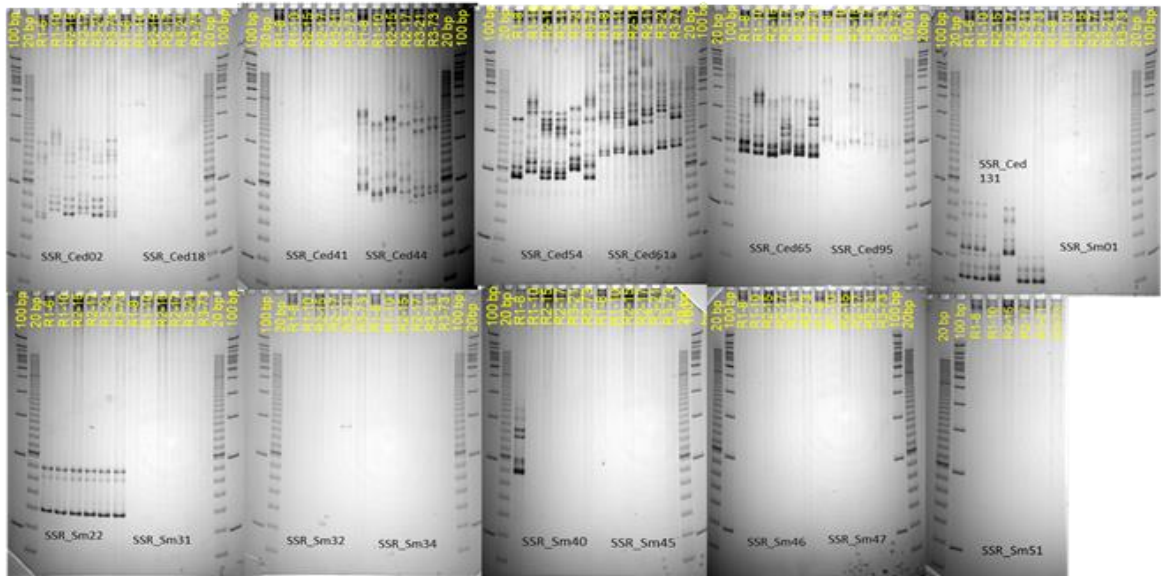
**Figura 3.** Funcionalidad del ADN extraído de muestras de individuos de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas, mediante PCR con el gen RbcL y visualizado en electroforesis en gel de agarosa 2 %. Los carriles indicados con números contienen 3  $\mu$ l de producto para cada muestra, en el primer carril 5  $\mu$ l del marcador (PROMEGA, Madison, WI, USA) de peso molecular de 100 bp.

### **Criba genética**

Para hacer la selección de marcadores polimórficos que serían empleados en el estudio de diversidad, se realizó una criba inicial en geles de agarosa al 2 % (Figura 4) y acrilamida al 8 % (Figura 5) con 6 muestras tomadas al azar en 9 pares de marcadores desarrollados por Hernández *et al.* (2008) y 10 por Lemes *et al.* (2002). Después se realizaron gradientes de  $T_m$  para los primers no amplificados y se visualizaron en geles de agarosa al 3 % y geles de acrilamida al 8 %. Algunos marcadores amplificaron y otros no. Los geles de acrilamida discriminaron mejor la separación de las bandas de ADN, en comparación con los de agarosa.



**Figura 4.** Criba genética inicial para la selección de cebadores en el análisis de diversidad en árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas, en geles de agarosa 2 %. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA) y en los siguientes seis carriles, el producto de PCR de cada muestra, indicada con el número del individuo muestreado. Los colores corresponden a un lugar de recolecta de la muestra.



**Figura 5.** Criba genética inicial para la selección de cebadores en el análisis de diversidad en árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas en geles de agarosa 2 %. En el primer carril se encuentra el marcador de 100 pb (PROMEGA, Madison, WI, USA) y en los siguientes seis carriles, el producto de PCR de cada muestra, indicada con el número del individuo muestreado.

Los marcadores seleccionados por su polimorfismo y con base en los resultados de estandarización fueron Ced02, Ced44, Ced54, Ced61a, Ced65, Ced131, Sm40 y Sm51. La temperatura de alineamiento en la PCR fue diferente en cada marcador (Cuadro 4). El resto de los marcadores mostraron un patrón de bandas monomórficas o no presentaron amplificación para los individuos analizados; por lo tanto, fueron descartados del estudio.

### **Diversidad genética**

Los cuatro grupos presentaron 100 % de polimorfismo; el número de alelos por locus ( $N_a$ ) para los grupos AS del norte y sur fue de 5.375 y 4.750, y para los grupos AnS del norte y sur fue 4.625 y 3.500, respectivamente. El número efectivo de alelos ( $N_e$ ) para los AS del norte y sur fue de 3.856 y 2.674, mientras que para los AnS del norte y sur fue 3.456 y 2.464. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) fue de 0.495 y 0.383 para los grupos de AS del norte y sur, y para los grupos AnS del norte y sur fue 0.400 y 0.340, respectivamente. El valor promedio de la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) fue de 0.629. Los AS del norte y sur presentaron valores de 0.718 y 0.569, mientras que los AnS del norte y sur tuvieron valores de 0.674 y 0.553 (Cuadro 5).

El mayor número de alelos privados ( $N^p$ ) se presentó en el grupo AS del norte (3), mientras que el grupo AS del sur no presentó  $N^p$  (Cuadro 6). El  $N^p$  entre árboles superiores (ambas regiones) y los no superiores (ambas regiones) fue igual (3). De los 10 alelos con mayor frecuencia (> 40%), cinco alelos se detectaron en el grupo AnS del sur, dos en AS del norte y dos del sur, mientras que el grupo AnS del norte únicamente presentó un alelo con mayor frecuencia con respecto a las demás (Figura 6). Las frecuencias alélicas de todos los alelos en cada locus fueron diferentes en cada grupo de árboles (Figura 7).



**Cuadro 4.** Características de los marcadores SSR seleccionados para análisis de frecuencias alélicas de 61 individuos de *Cedrela odorata* L. en el estado de Chiapas.

Marcador <sup>1</sup>	Secuencia de cebadores	Alelos observados	Tamaño esperado (pb <sup>2</sup> )	Tamaño obtenido (pb)	Tm <sup>3</sup> (°C)
Ced02	F:TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R:AACTTTCGAATTGGTTAAGG	10	130-170	136-162	55
Ced44	F:ACTCCATTAAGTCCATGAA R:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC	8	180-240	180-210	55
Ced54	F:GATCTCACCCACTTGAAAAA R:GCTCATATTTGAGAGGCATT	6	120-160	180-210	55
Ced131	F:CTCGTAATAATCCCATTCCA R:GGAGATATTTTTGGGGTTTT	6	80-120	176-200	55
Ced61a	F:CAATCAAACCAAAAATGGAT R:GCAAATTAACCAGAAAAACG	5	240-270	180-220	55
Ced65	F:GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R:GAGGTTCGATCAGGTCTTGG	5	160-200	250-270	55
Sm51	F:GCAATTTCCAGAAGAAACC R:CTGTAGGCGATAACAATCAG	4	138-182	140-144	50
Sm40	F:TGCTACTGTCAAGAGTGTAT R:GACAAACATGTACCACAAG	3	120-146	80-110	48

<sup>1</sup>Ced: marcadores específicos para *Cedrela odorata* (Hernández *et al.*, 2008). Sm: marcadores específicos para *Swietenia macrophylla* (Lemes *et al.*, 2002); <sup>2</sup>pb: pares.

**Cuadro 5.** Parámetros de diversidad genética en cuatro grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

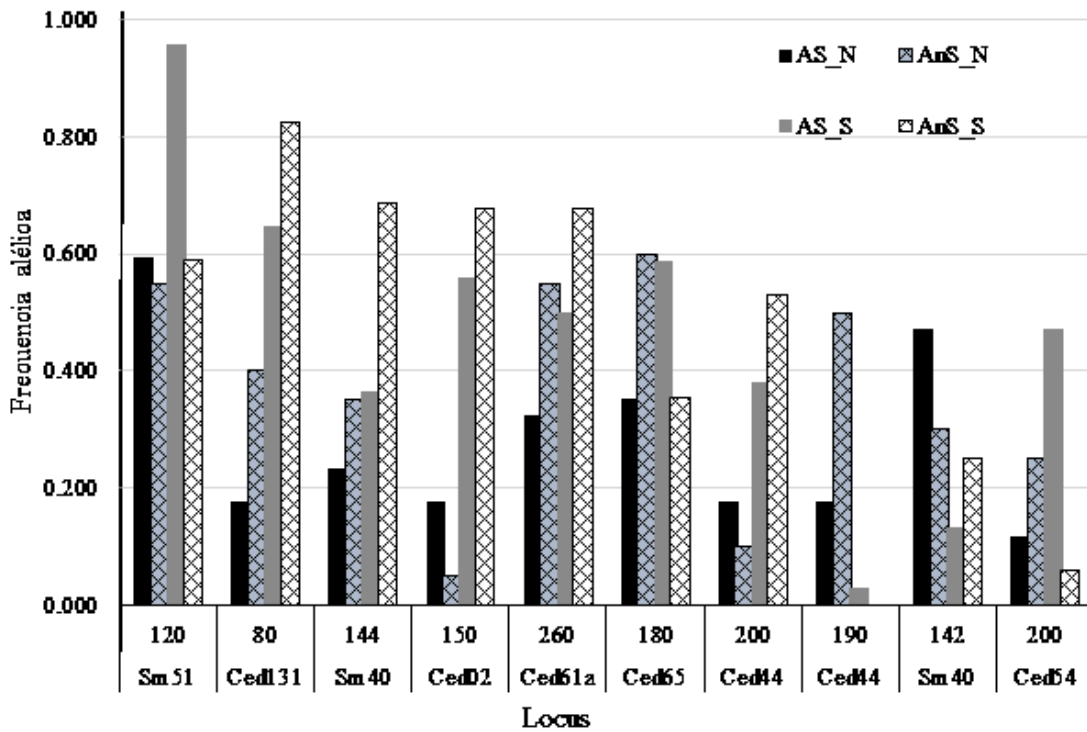
Región	grupos	<i>N</i>	% <i>P</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>N<sup>p</sup></i>
Norte	AS <sup>1</sup>	17	100	5.375	3.856	0.495	0.718	3
	AnS	10	100	4.625	3.459	0.400	0.674	2
Sur	AS	17	100	4.750	2.674	0.383	0.569	0
	AnS	17	100	3.750	2.464	0.340	0.553	1
	Promedio		100	4.625	3.113	0.405	0.629	
	Acervo*		100	6	3.679	0.412	0.693	

<sup>1</sup>AS: árboles superiores; AnS: árboles no superiores; *N*: Número de árboles; %*P*: Porcentaje de polimorfismo; *Na*: Número de alelos promedio por locus, *Ne*: Número de alelos efectivos, *Ho*: Heterocigosidad observada, *He*: Heterocigosidad esperada, *N<sup>p</sup>*: Número de alelos privados. \* Acervo, se asume que no existe estructura poblacional y que existe una sola población panmíctica.

**Cuadro 6.** Frecuencias alélicas de alelos privados obtenidos en los cuatro grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. muestreados en el estado de Chiapas.

Población	Locus	Alelo (pb)	Frecuencia (%)
AS <sup>1</sup> del norte	Ced54	180	0.059
AS del norte	Ced131	84	0.029
AS del norte	Sm51	122	0.031
AnS del norte	Ced02	140	0.100
AnS del norte	Ced02	166	0.050
AnS del sur	Ced02	136	0.118

<sup>1</sup>AS: árboles superiores; AnS: árboles no superiores; pb: pares de bases.



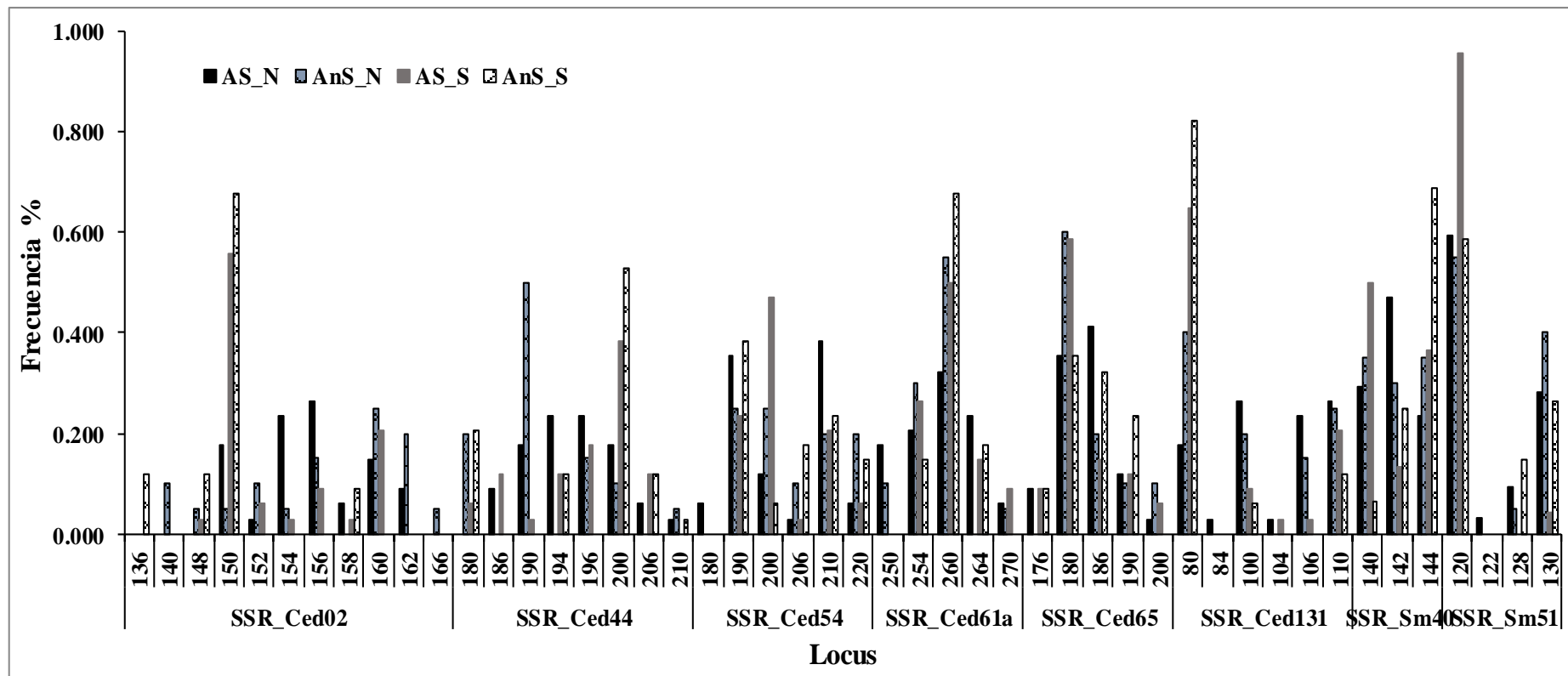
**Figura 6.** Alelos con mayor frecuencia alélica promedio en cuatro grupos de árboles (AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur) de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

El número total de alelos ( $N_a$ ) detectado con los ocho marcadores fue de 48, con un valor promedio de seis alelos por locus. El marcador Ced02 presentó el valor más alto, con 11 alelos, mientras que el marcador Sm40 presentó el valor más bajo, 3 alelos únicamente. El valor promedio del índice de fijación  $F_{is}$  fue de 0.359, el valor de  $F_{it}$  fue 0.418 y el valor promedio de diferenciación genética  $F_{st}$  fue de 0.091. El número de migrantes ( $N_m$ ) por generación inferido a partir de los datos de los ocho loci analizados fue de 3 (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Estimación promedio de los índices de fijación (estadísticos de Wright) y el número de migrantes ( $N_m$ ) basados en ocho loci polimórficos de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

<b>Cebador</b>	$N_a^I$	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	$N_m$
Ced02	11	0.492	0.562	0.136	1.587
Ced44	8	0.258	0.344	0.116	1.900
Ced54	6	0.487	0.515	0.055	4.276
Ced131	6	-0.039	0.086	0.121	1.821
Ced61a	5	0.385	0.417	0.051	4.666
Ced65	5	0.151	0.190	0.046	5.191
Sm51	4	0.529	0.576	0.098	2.289
Sm40	3	0.611	0.651	0.103	2.179
Promedio	6	0.359	0.418	0.091	2.989

$^I N_a$ : Número promedio de alelos por locus;  $F_{is}$ : Coeficiente de endogamia dentro de los grupos de árboles;  $F_{it}$ : Coeficiente de endogamia total;  $F_{st}$ : Coeficiente de diferenciación;  $N_m$ : Número de migrantes.

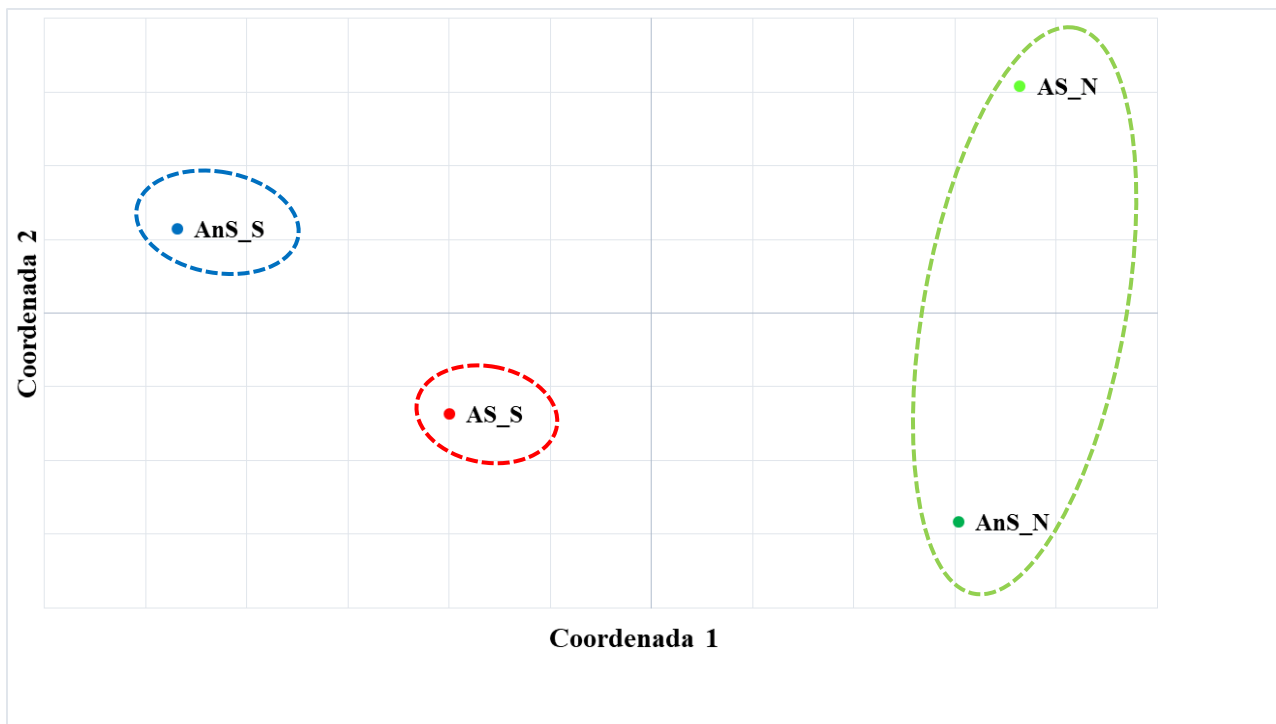


**Figura 7.** Frecuencias alélicas de 48 alelos en ocho loci polimórficos en cuatro grupos (AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur) de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

## Estructura genética

### *Análisis de Coordenadas Principales, Diferenciación Genética y Varianza Molecular (AMOVA)*

Existe una diferenciación entre los grupos de árboles de *C. odorata* al graficar las primeras dos coordenadas de la matriz de distancias genéticas de Nei, las que explican 80% de la varianza (Figura 8). El coeficiente de  $F_{st}$  de Wright (1951) indica una diferenciación entre los grupos. Sólo en el norte no se presentó diferenciación genética entre los dos grupos fenotípicos de árboles ( $F_{st} = 0.033$  Cuadro 8). La mayor parte de la variación se encontró dentro de los grupos, según el AMOVA ( $V = 92.16\%$ ) con un coeficiente de diferenciación  $F_{st} = 0.106$ . Entre grupos dentro de regiones 3.74 %, y entre regiones sólo un 4.10 % de la variación (Cuadro 9).



**Figura 8.** Variabilidad genética de las dos primeras coordenadas de las distancias genéticas en cuatro grupos de árboles (AS\_N: árboles superiores y AnS\_N: no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores y AnS\_S: no superiores del sur) de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

**Cuadro 8.** Diferenciación genética entre grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

<b>Grupo de árboles</b>	<b>AS_N</b>	<b>AnS_N</b>	<b>AS_S</b>	<b>AnS_S</b>
<b>AnS_N</b>	0.033	0.000		
<b>AS_S</b>	0.067	0.063	0.000	
<b>AnS_S</b>	0.080	0.078	0.062	0.000

AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur.

**Cuadro 9.** Análisis de varianza molecular y estimador de diferenciación genética de dos grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. en dos regiones de Chiapas.

<b>Factores</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>	<b><math>F_{st}</math></b>
Entre regiones	1	15.233	0.148	4.10	0.057
Entre grupos, dentro de regiones	2	12.225	0.128	3.74	0.052
Dentro de grupos	118	275.247	2.333	92.16	0.106
Total	121	302.705	2.609	100.00	

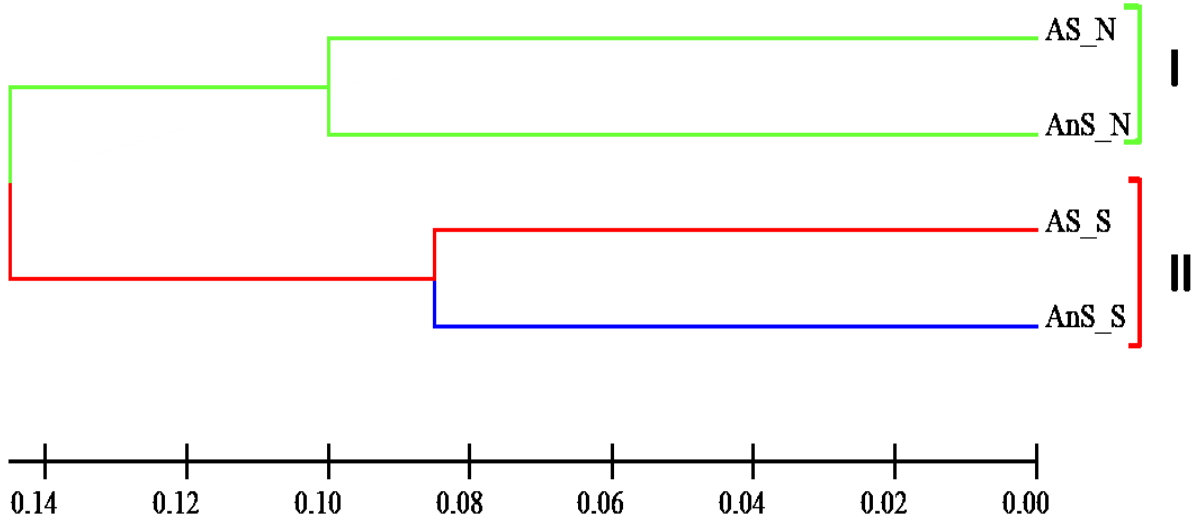
*Análisis de Distancia Genética de Nei (1972)*

El dendrograma generado a partir de las distancias genéticas de Nei, representadas gráficamente mediante el método neighbor-joining, reflejó un nivel de agrupamiento entre las regiones, pero no entre los grupos de fenotipos superiores vs. no superiores (Figura 9).

*Análisis de Asignación de Individuos*

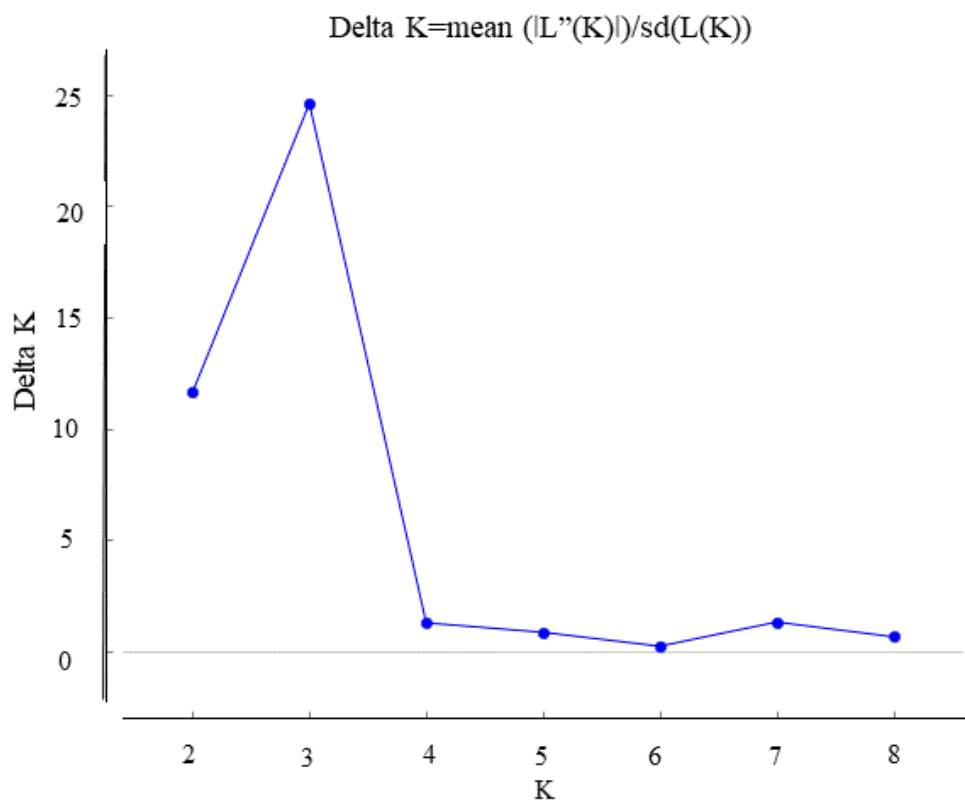
El análisis bayesiano de la asignación de árboles (asumiendo un modelo de entrecruzamiento y que los árboles de ambos grupos derivan de un ancestro común), mostró que el número más probable de grupos genéticos es  $K = 3$  (Figura 10). Cada árbol fue asignado a uno de los grupos genéticos. La proporción de color en cada grupo de árboles representa la fracción de ancestría con respecto a cada grupo genético (Figura 11). El grupo AS del sur se relaciona con el grupo uno, con un coeficiente de ancestría 0.506; los grupos AS y AnS del norte se relacionan

con el grupo dos, con un coeficiente de ancestría de 0.602 y 0.593, y el grupo AnS del sur con el grupo 3 con 0.768 (Cuadro 10).



**Figura 9.** Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) entre grupos de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas. (AS\_N: árboles superiores del norte; AnS\_N: árboles no superiores del norte; AS\_S: árboles superiores del sur; AnS\_S: árboles no superiores del sur).

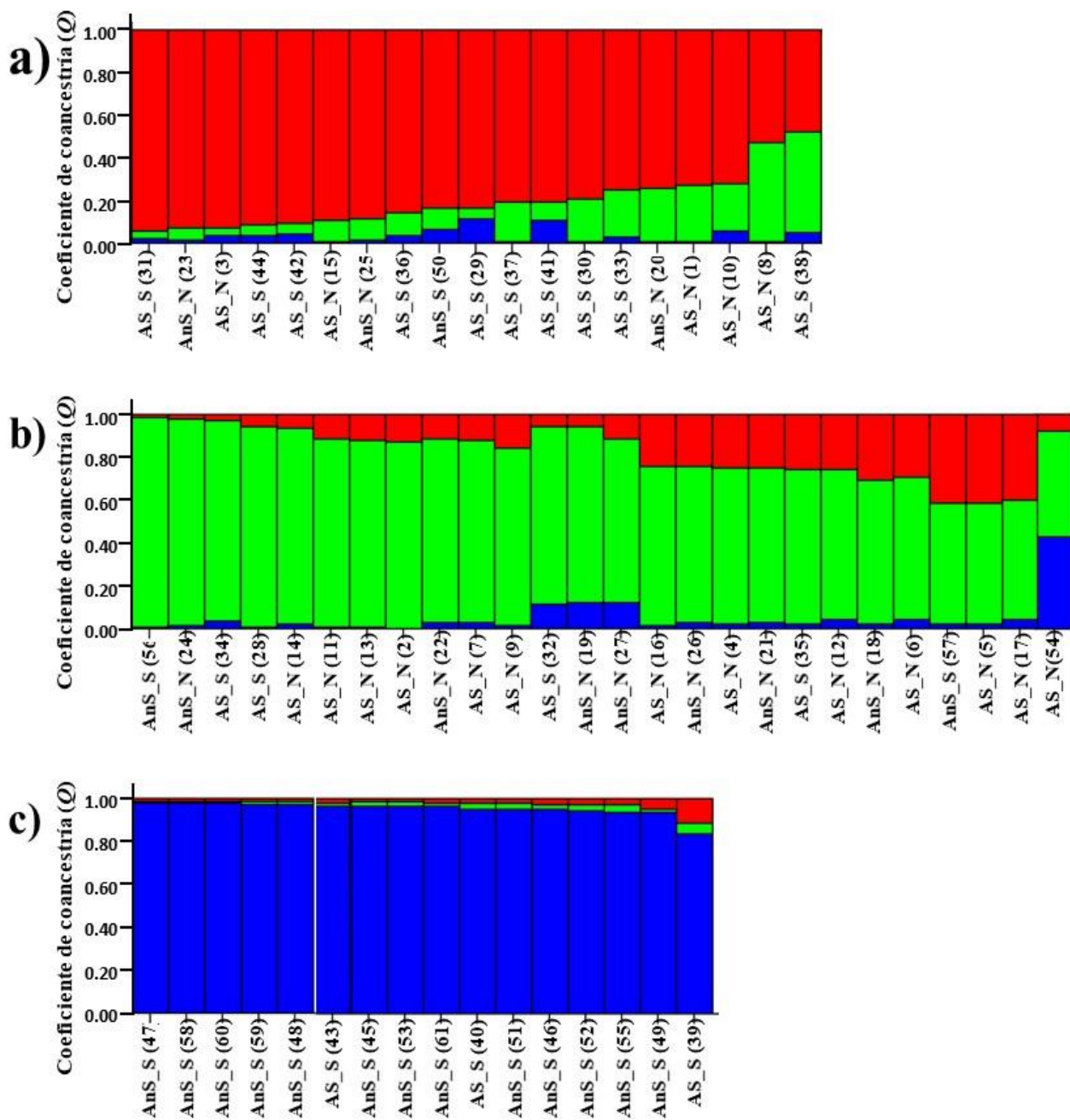




**Figura 10.** Punto de inflexión para asignación de grupos en  $K= 3$ , del análisis de estructura de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas por el método Evanno *et al.* (2005).

**Cuadro 10.** Coeficientes de ancestría (Q) estimada para los cuatro grupos fenotípicos de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas.

Grupo Fenotípico		Grupos Genéticos		
		1	2	3
Norte	Árboles superiores	0.371	0.602	0.027
	Árboles no superiores	0.364	0.593	0.043
Sur	Árboles superiores	0.506	0.291	0.203
	Árboles no superiores	0.092	0.14	0.768



**Figura 11.** Asignación de árboles de *Cedrela odorata* L. del estado de Chiapas por grupos genéticos. a) Grupo genético uno; b) Grupo genético dos; c) Grupo genético tres. Eje X: número de árbol y grupo fenotípico al que pertenece; Eje Y: coeficiente de coancestría de cada árbol.

## DISCUSIONES

### Diversidad genética

La riqueza alélica encontrada en los árboles seleccionados fenotípicamente superiores en bosques naturales de Chiapas es similar a los valores del grupo de árboles no superiores. Gutiérrez (2003) menciona que, al seleccionar árboles superiores para un proyecto de mejoramiento genético, se debe asegurar una base genética amplia y que represente la mayor variedad genética existente. Aravanopoulos (2018) menciona que, al seleccionar germoplasma con rasgos cuantitativos importantes económicamente, podrían resultar con una base genética restringida para las generaciones siguientes, debilitando la adaptación local. En este estudio se observó que los valores de diversidad genética promedio para el grupo de árboles superiores son ligeramente mayores que en los árboles no superiores. Además, los grupos de árboles del norte de Chiapas presentaron valores ligeramente mayores de diversidad genética ( $He= 0.718$  y  $0.674$ ), que los del sur ( $He=0.569$  y  $0.553$ ). Estas diferencias de diversidad pueden deberse a la mayor fragmentación de hábitat que se ha ocasionado en la región sur de Chiapas, por el uso extensivo de la tierra para ganadería, agricultura, cultivos como pastizal y palma africana. Además, la degradación forestal por establecimiento de cafetales o extracción de madera, en comparación con las otras regiones que aún conservan más de 50 % de su cobertura forestal (Covaleda *et al.*, 2016). Las poblaciones del norte probablemente tengan mayor oportunidad de flujo de genes con poblaciones de los estados colindantes.

Estudios comparativos de valores de diversidad genética en poblaciones naturales con manejo y sin manejo de *Pinus brutia* Ten., empleando marcadores RAPDs, detectaron un incremento en la homocigosidad (6%) respecto a las poblaciones naturales, concluyendo que este incremento fue el resultado de un efecto de endogamia (Lise *et al.*, 2007). White *et al.* (1999) al evaluar la variación genética en poblaciones fragmentadas de *Swietenia humilis* Zucc., en comparación con otra población de mayor tamaño (control) en Honduras, encontraron mayor número de alelos en la población control, así como una relación entre la pérdida de alelos de baja frecuencia y el tamaño de las poblaciones fragmentadas.

Siete de los diez alelos más comunes se encontraron en mayor frecuencia en los grupos de árboles no superiores, cinco en el sur y dos en el norte, lo cual puede tener un impacto negativo a

largo plazo en los grupos de árboles superiores, en la herencia de estos alelos hacia generaciones subsecuentes por pérdida de diversidad genética (Aravanopoulos, 2018). A largo plazo, las frecuencias alélicas en los árboles superiores deben monitorearse, para saber el efecto de la selección inicial en los niveles de riqueza alélica. Las diferencias de frecuencias alélicas entre árboles superiores y no superiores pueden deberse al balance entre la deriva genética que se ha provocado al seleccionar y el flujo genético entre los árboles (Eguiarte *et al.*, 2013).

El valor promedio de diversidad en el presente estudio fue de  $He=0.629$ , valor superior al registrado por Lesher-Gordillo *et al.* (2018) en poblaciones naturales del estado de Tabasco, México, con una  $He$  de 0.261 utilizando 9 marcadores microsatélites. Paredes *et al.* (2019) evaluó las diferencias genéticas de *C. odorata* en sitios de Bolivia con ocho marcadores SSR y encontró alta diversidad genética ( $He=0.83$  a  $0.89$ ), pero índices de fijación positivos, sugiriendo un efecto de endogamia. Soldati *et al.* (2013) al analizar con marcadores SSR y AFLP los patrones de distribución de la diversidad de *C. odorata*, encontraron mayor diversidad en los loci SSR que en AFLP, pero con los dos tipos de marcadores concluyeron que no había diferenciación genética por un flujo de genes debido al tamaño limitado de su distribución. En ese estudio se identificaron cuatro poblaciones prioritarias para conservación. Por otra parte, estudios de diversidad genética con marcadores SSR en otras Meliaceae como *Swietenia macrophylla*, encontraron valores de  $He=0.780$  en la Amazonia Brasileña (Lemes *et al.*, 2003), al igual que en Mesoamérica  $He=0.660$  (Novick *et al.*, 2003) con 10 marcadores, mientras que en Costa Rica los valores de diversidad fueron más bajos  $He=0.310$  (Lowe *et al.*, 2003). Gandara *et al.* (2014) desarrollaron y caracterizaron marcadores microsatélites para *C. fissilis* Vell, que se encuentra en peligro de extinción por fragmentación de bosques. Todos los marcadores fueron polimórficos, con diversidad genética de  $He=0.64$  a  $0.70$  y diferenciación genética significativamente alta entre las poblaciones. Las diferencias encontradas entre estos estudios pueden deberse a la historia evolutiva de la especie en los diferentes lugares de investigación, ya que juega un papel importante en el nivel y distribución de la diversidad genética (Hamrick *et al.*, 1992).

El mayor número de alelos privados ( $N^P$ ) se encontró en los AS del norte (3). Esto puede ser un reservorio para la especie en adaptación local a cambios ambientales y amortiguador de plagas o enfermedades a futuro (Romero *et al.*, 2003).

## Estructura genética

Los índices de fijación de Wright fueron positivos ( $F_{is} = 0.359$  y  $F_{it} = 0.418$ ), lo cual indica un exceso en la frecuencia de homocigotos. Estos valores pueden ser ocasionados por tres factores: altos niveles de endogamia, la estructura y subestructura de los grupos y el número limitado de árboles en el estudio, dando como resultado el bajo número de alelos obtenidos (Romero *et al.*, 2003). Las poblaciones naturales de esta especie se encuentran relativamente fragmentadas, lo que la ha colocado en la categoría de protección especial por la NOM-059 (SEMARNAT, 2010). La pérdida de la cantidad de hábitat, disminuye la densidad regional de las especies. Esta tendencia aumenta el riesgo de que alcance un umbral por debajo del cual son viables (Santos y Telleria, 2006).

Los árboles superiores no presentaron diferenciación genética con los árboles no superiores, pero sí hubo una diferenciación entre los grupos del norte con los del sur, ya que hay un flujo genético limitado entre las dos regiones. Estos resultados tienen un valor práctico en la planificación de recolección de germoplasma para reproducción y conservación de genes (White *et al.*, 2007). Se registraron tres migrantes por generación ( $Nm$ ). Hartl y Clark (2007), mencionan que al menos un migrante por generación puede evitar la diferenciación de las poblaciones (en nuestro caso grupos de árboles) por el efecto de la deriva genética.

El AMOVA reflejó que la mayor parte de la variación se encontró dentro de los grupos ( $V = 92.16\%$ ). Hamrick y Godt (1996) menciona que las especies forestales con áreas de distribución geográfica amplia, apareamiento aleatorio y dispersión de semillas por el viento o animales, tienen más variación genética dentro de las poblaciones, pero menos variación entre las poblaciones.

Los resultados del análisis de estructura genética mostraron tres grupos genéticos ancestrales en los 61 árboles evaluados. Los tres grupos genéticos generados presentaron valores intermedios de ancestría mixta. En el grupo genético uno se encuentran el grupo de árboles superiores de la región sur, en el grupo 2 los dos grupos de árboles de la región norte, y en el grupo tres el grupo de árboles no superiores del sur (Figura 1). Estos resultados de estructura coinciden con el PCoA generado por las distancias genéticas de Nei. Por otro lado, el dendrograma refleja dos grupos principales, dividiendo los grupos del norte y del sur,

enfaticando la diferenciación geográfica regional de las poblaciones naturales de la especie. Los grupos generados con los árboles superiores, que se encuentran en la etapa inicial de evaluación en ensayos de procedencias-progenies permitirán verificar si esa diferenciación se manifiesta también en características de valor adaptativo y podrían servir al mismo tiempo como un reservorio de la variación genética de la especie en el estado de Chiapas.

## CONCLUSIONES

El nivel de diversidad genética encontrado en los cuatro grupos de árboles de *Cedrela odorata* en el estado de Chiapas es alto comparado al reportado por otros autores. Con los marcadores evaluados no se detectó pérdida de diversidad genética al seleccionar árboles superiores para un programa de mejoramiento genético, en comparación con los árboles no superiores.

No existe diferenciación genética entre los árboles superiores y los no superiores, pero si una diferenciación geográfica entre los grupos de árboles del norte y del sur. Se encontró estructura genética, con tres grupos genéticos ancestrales representados en los árboles muestreados.

### **CAPÍTULO III. DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE *Cedrela odorata* L. EN EL ESTADO DE CHIAPAS MEDIANTE MICROSATÉLITES**

#### **RESUMEN**

La distribución natural de *Cedrela odorata* L. en México, especie forestal de gran valor económico y considerada como una de las maderas tropicales preciosas más apreciadas, ha disminuido considerablemente por la extracción excesiva de madera. Se encuentra en la NOM-059 sujeta a protección especial y en la lista de la UICN, como especie vulnerable. Esta disminución ha ocasionado la pérdida de diversidad genética y la aparición de endogamia en poblaciones naturales de la especie. El objetivo del presente estudio fue evaluar la diversidad genética de *C. odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas (norte=25, centro=13 y sur=25). Se emplearon ocho marcadores microsátélites de la familia Meliaceae. El número total de alelos encontrado fue 48, con cuatro alelos privados para la región norte, y solamente uno en las regiones centro y sur. La diversidad genética fue ligeramente superior en la región norte ( $He=0.724$ ) en comparación con la región centro ( $He=0.694$ ) y sur ( $He=0.615$ ). Los valores de los índices de fijación fueron positivos ( $F_{is}=0.374$  y  $F_{it}=0.406$ ) indicando la presencia de endogamia y deficiencia de heterocigotos. El valor más alto de  $F_{st}$  fue entre la región norte y sur (0.074), indicando diferenciación genética alta, comparado con diferenciación entre la región norte y centro (0.018). El análisis bayesiano identificó dos grupos genéticos, asignando cada árbol a un grupo, con respecto al coeficiente de ancestría. Esto concuerda con los resultados del dendrograma y el análisis de coordenadas principales (PCoA). El análisis de varianza molecular (AMOVA), sugiere que la mayor variación genética se encuentra dentro de regiones (93.94 %). La diversidad genética identificada en el presente estudio es superior a los resultados reportados en otros estudios. La región con mayor diversidad fue la del norte. El flujo genético fue bajo entre la región del norte y sur, coincidiendo con los valores altos de diferenciación genética.

## INTRODUCCIÓN

La diversidad genética en especies forestales es la base de los procesos de adaptación a diferentes condiciones ambientales a las que se enfrentan las poblaciones naturales (Alía *et al.*, 2003). La diversidad puede ser afectada por la fragmentación del hábitat y cambio de uso de suelo por actividades antropogénicas (Cayuela, 2006; Covaleda *et al.*, 2016). Esta situación puede originar una reducción del tamaño poblacional, ocasionando cambios en la estructura genética entre poblaciones, además de la consecuente disminución de la riqueza alélica, homocigosidad, depresión endogámica y mayor expresión de alelos no favorables (Leshner-Gordillo *et al.*, 2018; Piotti, 2009). Todos estos fenómenos tienen un efecto negativo en la producción de semillas, incluyendo una menor viabilidad, capacidad reproductiva, supervivencia, y crecimiento (Pico y Quintana, 2005; Quiroz-Vázquez *et al.*, 2017). Adicionalmente, ocurre la ampliación demográfica de especies generalistas y el descenso de las especialistas, y la pérdida de especies silvestres que dependen del hábitat (Gurrutxaga y Lozano, 2006).

*Cedrela odorata* L., conocida como cedro rojo, es considerada como una de las maderas tropicales más apreciadas, con una demanda alta en la industria forestal. Es utilizada para la fabricación de varios artículos, construcciones de uso exterior por su resistencia a termitas y a la pudrición por contacto con el suelo (Cintrón, 1990), además de usos medicinales y artesanales (Galán *et al.*, 2008; Pennington y Sarukhán, 2005). Su distribución natural en México incluye la región del Golfo, que abarca desde el sur de Tamaulipas, sureste de San Luis Potosí hasta la península de Yucatán. En el Pacífico, desde Sinaloa hasta Guerrero, y en el norte y sur de Chiapas (Hernández *et al.*, 2018; Patiño, 1997). Actualmente hay una reducción del nicho ecológico de la especie en México, ocasionada principalmente por la extracción excesiva de la madera y en ocasiones hasta ilegal (Hernández *et al.*, 2018), razón por la cual ha sido clasificada como especie con régimen de protección especial (NOM-059, SEMARNAT, 2010) y como especie vulnerable en la lista roja de la UICN (2013).

El estado de Chiapas ha sufrido cambios de uso de suelo por la deforestación de los bosques secundarios templados, principalmente para establecimiento de parcelas agrícolas de subsistencia (milpa) en la región de los Altos; deforestación de la vegetación secundaria de la selva alta perennifolia por ganadería extensiva en la región de la Selva Maya y en la región Soconusco, y degradación forestal de bosques en la Sierra Madre (Covaleda *et al.*, 2016). Ante



estos escenarios de cambio de uso de suelo y destrucción del hábitat natural del cedro rojo, es importante conocer el estatus que guarda el acervo genético de esta importante especie.

Los marcadores moleculares representan una alternativa en el desarrollo de estrategias de aprovechamiento y conservación de especies, poblaciones y ecosistemas (Becerra y Paredes, 2000; Oliveira *et al.*, 2006;). Una clase de marcadores frecuentemente utilizados para estudios de diversidad genética, son los microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats, por sus siglas en inglés). Estos marcadores se encuentran en secuencias codificantes y no codificantes en todo el genoma (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Oliveira, 2006). Son marcadores que generan datos codominantes, multialélicos y para su implementación, no es necesario trabajar con ADN de alta calidad, además de que requieren cantidades mínimas de ADN comparados con otros sistemas, y son altamente reproducibles (Romero, 2009). Sus principales desventajas son que requieren de largo tiempo para su desarrollo y de un presupuesto alto para su diseño, además de que son especie-específicos (Becerra y Paredes, 2000; González, 2003).

Los microsatélites han sido desarrollados para varias especies y en algunos casos se ha demostrado su transferibilidad entre especies del mismo género y/o familia (Gallo *et al.*, 2006). Tienen un amplio espectro de aplicaciones, desde los estudios de diversidad genética (Soldati *et al.*, 2013), paternidad (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005), flujo de genes entre poblaciones (Cavers *et al.*, 2013; Gallo *et al.*, 2006), cartografía de características cuantitativas (Becerra y Paredes, 2000), hasta la supervisión y monitoreo de especies en peligro de extinción (Gandara *et al.*, 2014).

El objetivo del presente estudio fue estimar la diversidad y estructura genética de cedro rojo en tres regiones del estado de Chiapas, empleando marcadores microsatélites, para sugerir una estrategia adecuada de obtención y uso de germoplasmas y conservación de los recursos genéticos de la especie en el estado, de acuerdo a los valores de diversidad y flujo genético.

## MATERIALES Y MÉTODOS

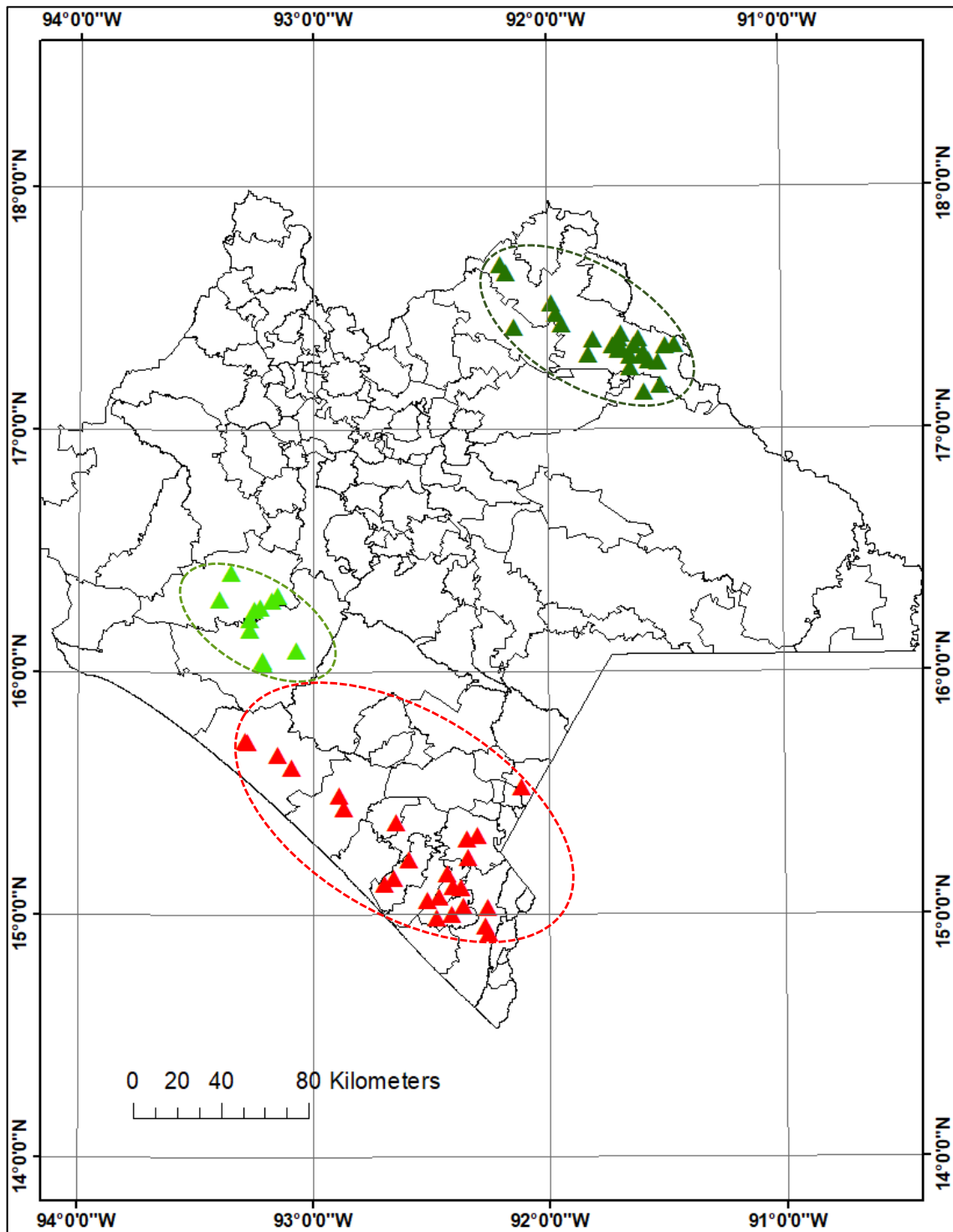
### Análisis de datos

En el estudio se incluyeron muestras de 63 árboles, 25 recolectados de la región norte, 13 del centro (el número de árboles fue menor debido al reducido tamaño de poblaciones, lo cual no permitió la recolección del mismo número de muestras) y 25 del sur (Figura 12). El procesamiento de las muestras fue el mismo del capítulo II, al igual que los primers utilizados.

Los tamaños de las bandas fueron estimados con base en los fragmentos de tamaño conocido de los marcadores de referencia. Los datos fueron procesados con el software GenAlEx 6.5 (Peakall *et al.*, 2012) y se calcularon los parámetros de diversidad siguientes para las tres regiones: porcentaje de loci polimórficos ( $%P$ ), número promedio de alelos por locus ( $N_a$ ), número efectivo de alelos ( $N_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) y los índices de Wright (1951). Además, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCoA) para las tres regiones con el coeficiente de similaridad de Nei (1972).

Con la matriz de distancias genéticas de Nei (1972) se elaboró un dendrograma por el método de Neighbour-Joining, implementado en el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011). El análisis de varianza molecular (AMOVA) se usó para estimar la variación genética existente dentro y entre regiones. Los resultados fueron obtenidos con ayuda del programa Arlequín 3.5 (Escoffier *et al.*, 2010).

La estructura genética se determinó con el software STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), utilizando un enfoque sistemático de agrupamiento bayesiano, y aplicando el método de Cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC). El proceso MCMC se inició asignando aleatoriamente los árboles a un número determinado de grupos  $K = 1$  hasta  $K = 6$ . Los árboles se fueron asignando a cada grupo, con base en las estimaciones de frecuencia. Para este proceso se realizaron 10 réplicas independientes, cada una con 200,000 pasos de MCMC, tras analizarlos 100,000 veces, con un modelo de ancestría de mezclas y frecuencias alélicas correlacionadas. El valor más probable de  $K$  fue determinado por el método de Evanno *et al.*, (2005) implementado en el programa STRUCTURE HARVESTER en línea ([http://taylor0.biology.ucla.edu/struct\\_harvest/](http://taylor0.biology.ucla.edu/struct_harvest/)).



**Figura 12.** Puntos de recolección de 63 muestras de *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas. Los triángulos de color verde oscuro indican los árboles muestreados de la región norte; los verde claro de la región centro y los rojos de la región sur.

## RESULTADOS

### Diversidad genética

Las tres regiones presentaron un porcentaje de polimorfismo de 100. El número promedio de alelos por locus ( $N_a$ ) fue de 5.333, variando de  $N_a=5.750$  en la región norte hasta  $N_a=5.000$  en la región sur. El valor promedio del número efectivo de alelos ( $N_e$ ) fue de 3.592, el valor máximo fue para la región norte ( $N_e=4.104$ ) y el valor mínimo se encontró en la región sur ( $N_e=2.932$ ). La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) promedio fue de 0.430, fluctuando de 0.472 para la región norte a 0.390 en la región sur. La heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) promedio fue de 0.678, el máximo valor se detectó en la región norte ( $H_e= 0.724$ ) mientras que la región sur presentó el menor valor ( $H_e=0.615$ ). El mayor número de alelos privados ( $N^p$ ) se presentó en la región norte con cuatro (Cuadro 11).

**Cuadro 11.** Parámetros de diversidad genética de *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas.

Región	$N$	%P	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$N^p$
Norte	25	100	5.750	4.104	0.472	0.724	4
Centro	13	100	5.250	3.739	0.427	0.694	1
Sur	25	100	5.000	2.932	0.390	0.615	1
Promedio		100	5.333	3.592	0.430	0.678	
Acervo*		100	6.000	3.903	0.431	0.714	

$N$ : Número de individuos; %P: Porcentaje de polimorfismo;  $N_a$ : Número de alelos promedio por locus,  $N_e$ : Número de alelos efectivos,  $H_o$ : Heterocigosidad observada,  $H_e$ : Heterocigosidad esperada,  $N^p$ : Número de alelos privados. \*Acervo, se asume que no existe estructura poblacional y que existe una sola población panmítica.

Empleando ocho marcadores polimórficos, se identificaron 48 alelos ( $N_a$ ), con un valor promedio de seis alelos por locus. Se encontraron diferencias en el número de alelos identificados por cada marcador (Cuadro 12). El marcador Ced02 presentó el valor más alto, con 11 alelos mientras que el marcador Sm40 presentó el valor más bajo, con 3 alelos únicamente.

Los valores de  $H_o$  y  $H_e$  fueron diferentes para cada locus. El valor promedio del índice de fijación  $F_{is}$  fue de 0.374, el valor de  $F_{it}$  fue 0.409 y el valor promedio de diferenciación genética  $F_{st}$  fue de 0.051. El número de migrantes ( $Nm$ ) por generación inferido a partir de los datos de los ocho loci analizados fue de 7.226 (Cuadro 12).

**Cuadro 12.** Estimación promedio de diversidad genética, índices de fijación de Wright (1951) y número de migrantes ( $Nm$ ) basados en ocho loci polimórficos de *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas.

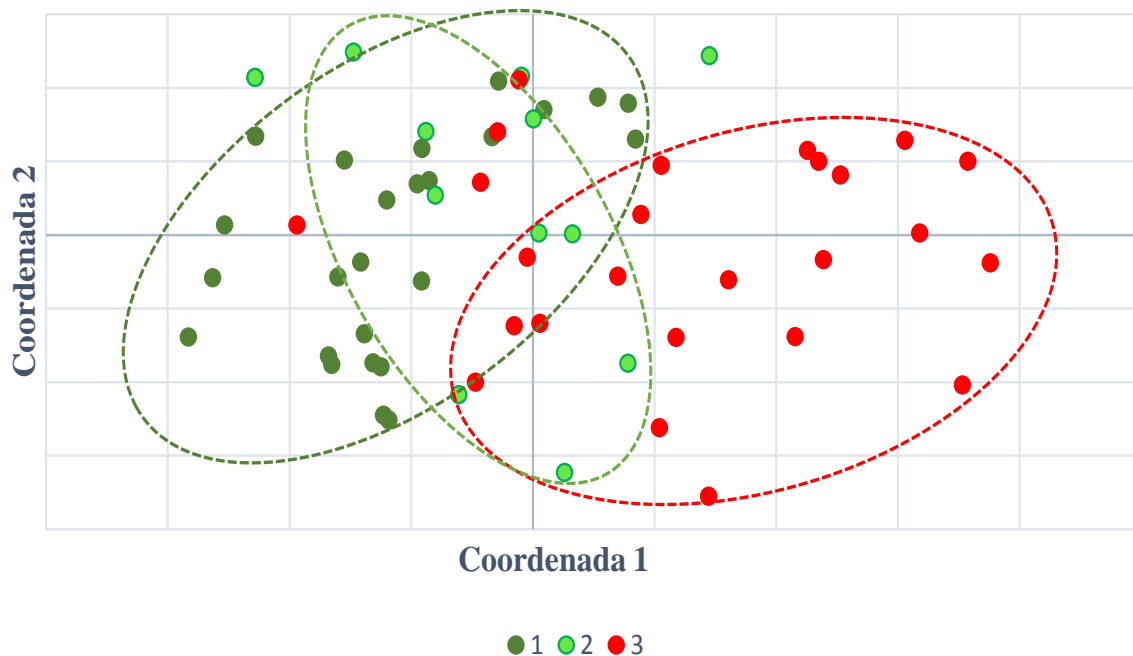
Marcador	$N_a$	$F_{is}$	$F_{it}$	$F_{st}$	$N_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	$Nm$
Ced02	11	0.483	0.531	0.093	5.083	1.740	0.382	0.738	2.432
Ced44	8	0.220	0.276	0.071	4.591	1.725	0.605	0.776	3.265
Ced54	6	0.509	0.530	0.044	4.102	1.508	0.369	0.751	5.422
Ced131	6	0.193	0.266	0.091	3.520	1.309	0.528	0.654	2.501
Ced61a	5	0.224	0.238	0.018	3.019	1.238	0.512	0.660	13.924
Ced65	5	0.244	0.260	0.022	3.790	1.435	0.553	0.731	11.303
Sm51	4	0.541	0.549	0.017	1.987	0.867	0.226	0.493	12.817
Sm40	3	0.574	0.596	0.051	2.640	1.024	0.264	0.618	4.615
Promedio	6	0.374	0.406	0.051	3.592	1.356	0.430	0.678	7.226

$N_a$ : No. promedio de alelos por locus;  $F_{is}$ : Coeficiente de endogamia dentro de las regiones;  $F_{it}$ : Coeficiente de endogamia total;  $F_{st}$ : Coeficiente de diferenciación;  $N_e$ : Numero de alelos efectivos;  $I$ : Índice de Shannon;  $H_o$ : Heterocigosidad observada;  $H_e$ : Heterocigosidad esperada;  $Nm$ : No. de migrantes.

## Estructura genética

### *Análisis de Coordenadas Principales*

La matriz de distancias genéticas de Nei, entre los árboles de *C. odorata*, fue representada en un gráfico de dos dimensiones para medir disimilitud genética (Nei y Li 1979) entre los árboles en cada región. La distribución infiere que hay una diferenciación entre la región del sur, con respecto a la del norte y centro (Figura 13). El valor acumulativo de los tres primeros componentes explicó solamente 25.94 % de la varianza acumulada.



**Figura 13.** Análisis de Coordenadas Principales (PcoA). Representación visual de las dos primeras coordenadas, a partir de las distancias genéticas de Nei (1972). El número 1 representa los árboles de *Cedrela odorata* L de la región norte, el 2 región centro y el 3 de la región sur, del estado de Chiapas.

#### *Análisis de Diferenciación Genética*

El coeficiente de  $F_{st}$  de Wright (1951) entre la región norte y centro fue de 0.018. Las regiones norte y sur presentaron el valor de diferenciación más alto (0.074), mientras que la región centro y sur presentan un valor de 0.058.

#### *Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)*

El AMOVA se llevó a cabo considerando tres regiones estudiadas del estado de Chiapas, calculando la variación molecular atribuible a la diferenciación entre y dentro de las regiones. La división de la variación (Cuadro 13) indica que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de las regiones (93.94 %) con un coeficiente de diferenciación  $F_{st}$  de 0.061 y en menor proporción, entre regiones (6.06 %).

**Cuadro 13.** Análisis de varianza molecular y estimador de diferenciación genética de árboles de *Cedrela odorata* L., en tres regiones del estado de Chiapas.

<b>Factores</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componentes de varianza</b>	<b>% de variación</b>	$F_{st}$
Entre regiones	2	19.12	0.14	6.06	0.045
Dentro de regiones	175	379.35	2.17	93.94	0.061
Total	177	398.47	2.31	100.00	

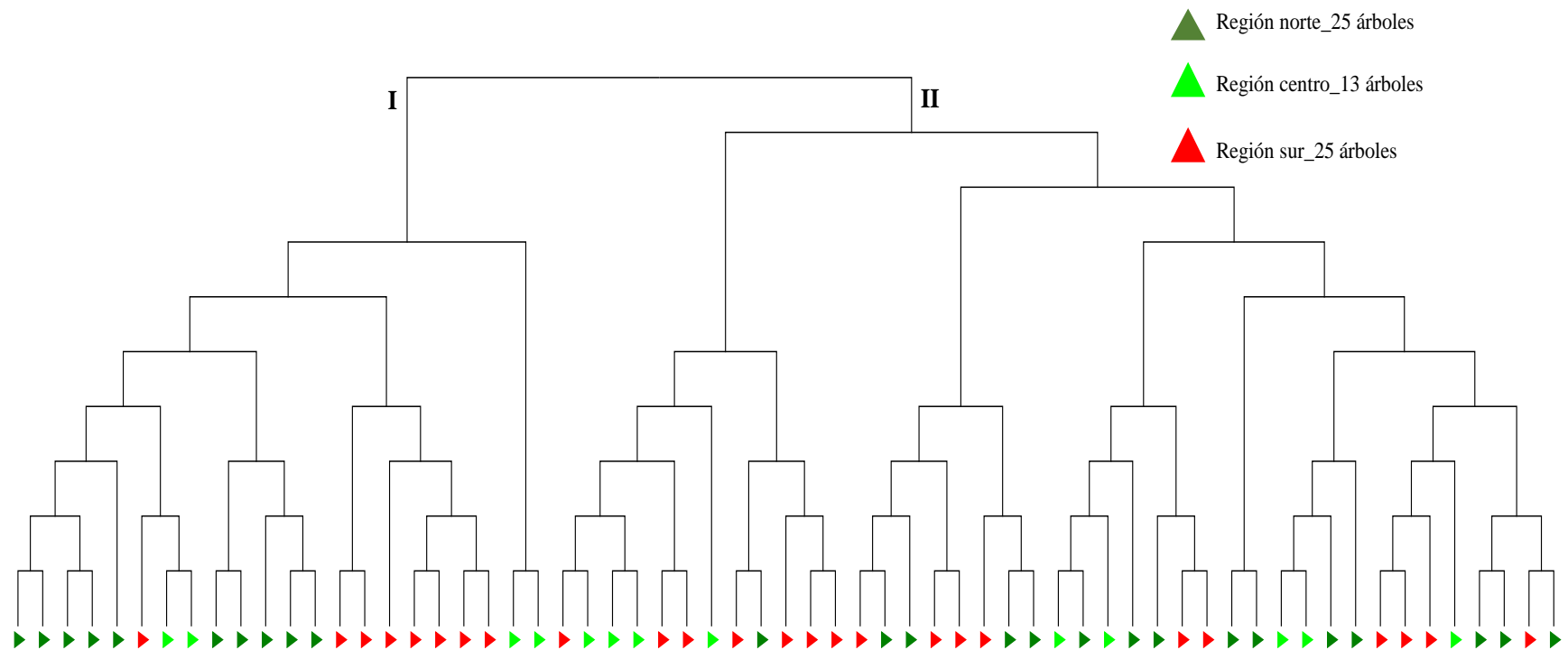
AMOVA: Análisis de varianza molecular,  $F_{st}$ : Coeficiente de diferenciación genética.

*Análisis de Distancia Genética de Nei (1972)*

El dendrograma generado a partir de las distancias genéticas de Nei (1972), representadas gráficamente mediante el método Neighbor-joining reflejó dos grupos principales (Figura 14). El grupo I presenta en mayor proporción árboles de la región norte, seguidos por los del sur y en menos proporción, por árboles de la región centro. En contraste, el grupo II presenta en mayor proporción árboles de la región sur, seguidos de árboles de la región norte y finalmente, por árboles de la región centro.

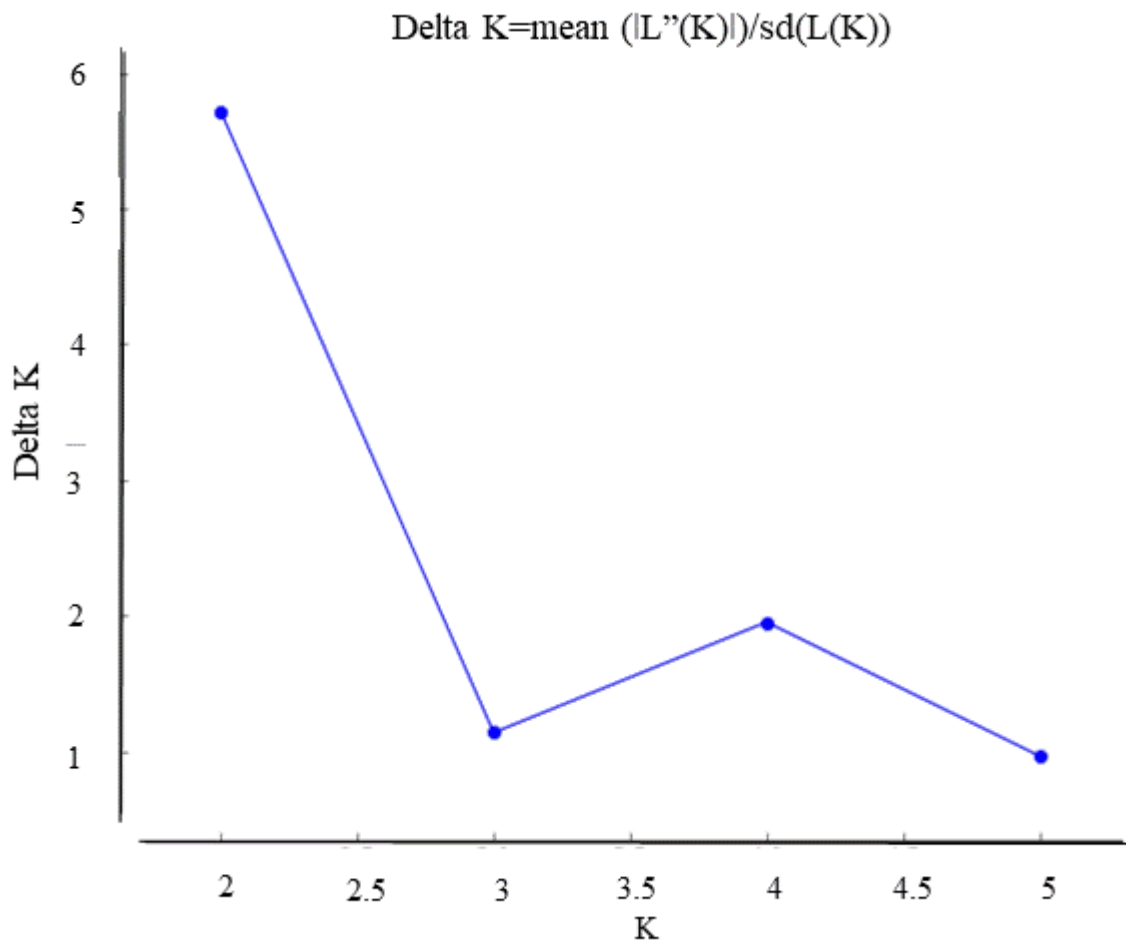
*Análisis de Asignación de Individuos*

El análisis bayesiano de la asignación de los árboles, al comparar las probabilidades, indicó que el número más probable de grupos genéticos fue de  $K=2$  (Figura 15), asumiendo un modelo de entrecruzamiento y que los árboles de las tres regiones derivan de un ancestro común. Cada árbol fue asignado a uno de los grupos genéticos. La proporción de color en cada región representa la fracción de ancestría con respecto a cada grupo genético correspondiente (Figura 16). La región norte pertenece al grupo genético dos con un coeficiente de ancestría de 0.864, al igual que la región centro con un valor de 0.674 y la región sur corresponde al grupo uno, con un coeficiente de ancestría de 0.690 (Cuadro 14).



**Figura 14.** Dendrograma basado en distancias genéticas (Nei, 1972) para árboles de *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas. Las regiones están representadas por el color del triángulo.

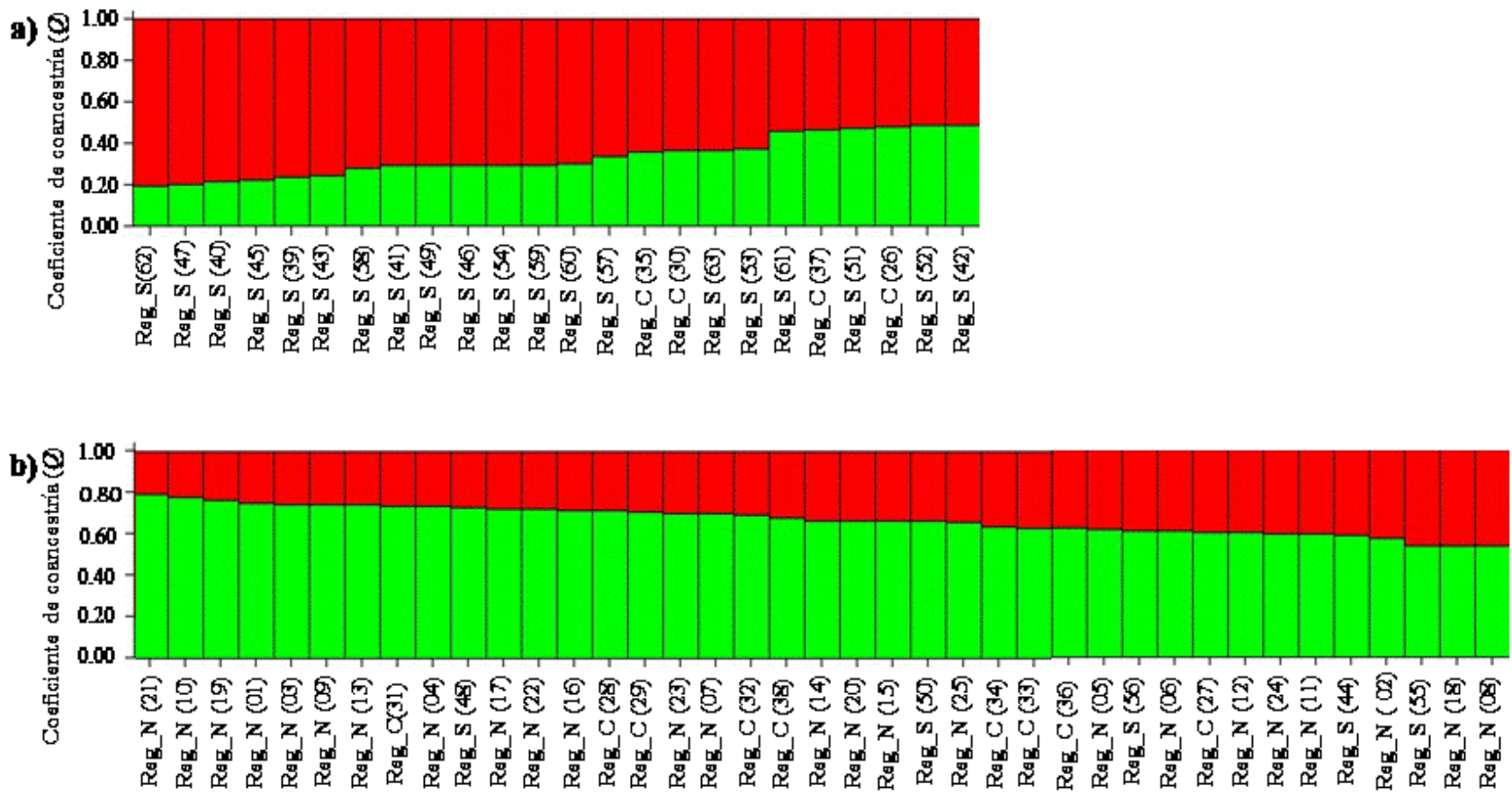




**Figura 15.** Punto de inflexión para asignación de grupos en  $K= 2$ , del análisis de estructura de árboles de *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas, mediante el método Evanno *et al.* (2005).

**Cuadro 14.** Coeficientes de ancestría ( $Q$ ) estimada para árboles *Cedrela odorata* L. en tres regiones del estado de Chiapas.

Región	Grupos Genéticos	
	1	2
Norte	0.136	0.864
Centro	0.326	0.674
Sur	0.690	0.310



**Figura 16.** Asignación de árboles de *Cedrela odorata* L., en tres regiones del estado de Chiapas por grupos genéticos. a) Grupo genético I; b) Grupo genético II. Eje X: número de árbol y la región a la que pertenece (Reg\_N: Región Norte, Reg\_C: Región Centro y Reg\_S: Región Sur); Eje Y: valor del coeficiente de ancestría de cada árbol.

## DISCUSIONES

### Diversidad genética

La diversidad genética encontrada en árboles de *C. odorata* de tres regiones de Chiapas fue de  $He= 0.678$ . Este valor es menor al encontrado en poblaciones de la misma especie en Bolivia ( $He= 0.83$  a  $0.89$ ) utilizando siete marcadores SSR en 81 árboles de cedro en tres sitios (Paredes *et al.*, 2019). Hernández *et al.* (2008) analizaron 30 familias de cedro rojo, con seis poblaciones procedentes del norte y seis del centro de Mesoamérica, empleando nueve marcadores SSR. Reportaron un valor promedio de  $He= 0.865$ , sin encontrar diferencias de este valor entre ambas regiones (norte=  $0.870$  y centro=  $0.860$ ). En el presente estudio, en un área menor, se detectaron diferencias en los valores de  $He$  para las regiones analizadas (norte=  $0.722$ , centro=  $0.694$  y sur=  $0.607$ ). Las diferencias en el valor de diversidad genética pueden deberse a la mayor fragmentación de hábitat que se ha ocasionado en la región sur de Chiapas, por el uso de suelo para ganadería, agricultura, cultivos como pastizal y palma africana. Además, la degradación forestal por establecimiento de cafetales o extracción de madera, en comparación con las otras regiones que aún conservan más de 50 % de su cobertura forestal (Covaleda *et al.*, 2016).

De la Torre (2013) realizó un estudio de diversidad genética en Perú empleando marcadores AFLP en 601 árboles, con un resultado menor de  $He= 0.325$ , al igual que Tijerino-López (2008) en Nicaragua utilizando RAPD en 92 árboles de cedro ( $He= 0.311$ ). Becerra y Paredes (2000) mencionan que los microsatélites son más variables (polimórficos) que los AFLP's, RAPD's, RFLP's e isoenzimas. Esto se confirma con el estudio de Soldati *et al.* (2013), quienes analizaron el uso de marcadores SSR y AFLP para determinar patrones de distribución de la diversidad de *C. odorata*, encontrando mayor diversidad en los loci SSR que en AFLP. Las discrepancias encontradas en los diferentes estudios pueden deberse a la biología e historia de la especie, al marcador utilizado y a la distribución geográfica de las poblaciones en cada estudio (Hamrick *et al.*, 1992). Alfonso-Corrado *et al.* (2014) recomiendan analizar también plantaciones forestales manejadas y compararlas con las poblaciones naturales de la especie para entender mejor el efecto e impacto genético del manejo forestal. La región norte presentó el mayor número de alelos privados ( $N^p=4$ ). Estos alelos pueden ser funcionales en adaptación a disturbios ambientales y amortiguador de plagas o enfermedades a futuro (Yanchuk *et al.*, 2008).

## Estructura genética

A nivel de loci se encontraron deficiencias de heterocigotos, de acuerdo a los índices de Wright ( $F_{is}= 0.374$  y  $F_{it}= 0.406$ ) en las tres regiones analizadas. Estos valores sugieren presencia de endogamia en las tres regiones. Estos valores pueden ser influenciados por el número limitado de árboles en el estudio (Romero *et al.*, 2003) o por efecto de las fuerzas evolutivas como deriva genética, selección y un limitado flujo de genes (Eguiarte *et al.*, 2013; Piñero *et al.*, 2008). Lo anterior puede ocasionar un efecto negativo en la capacidad reproductiva, supervivencia, crecimiento y reproducción (Pico y Quintana, 2005; Quiroz-Vázquez *et al.*, 2017).

El valor de  $F_{st}$  (0.051) infiere una diferenciación genética moderada entre las tres regiones. Estos resultados son contrastantes con los reportados por Lesher-Gordillo *et al.* (2018) para poblaciones de Tabasco, en donde obtuvieron un valor de  $F_{st}= 0.419$ , indicando la presencia de una alta diferenciación genética. En el estudio de Lesher-Gordillo *et al.* (2008) el valor de  $Nm$  fue bajo (0.797), factor que contribuyó al valor de la diferenciación genética reportada. Patiño *et al.* (2008) mencionan que cuando el  $Nm$  es menor a 1, se puede decir que la deriva genética actúa independientemente en cada una de las poblaciones. En el presente estudio, el valor de  $Nm$  fue de 7.226, el cual indica un flujo de migrantes altos entre las regiones analizadas, contribuyendo a que haya sólo valores moderados de diferenciación genética entre las tres regiones. Eguiarte *et al.* (2013) mencionan que cuando  $Nm$  es mayor a 1 en cada generación, es suficiente para debilitar la diferenciación genética, ya que entre mayor sea el flujo, más parecidas serán las poblaciones.

El coeficiente de diferenciación genética por regiones fue variado, presentando una diferenciación genética alta significativa ( $p=0.001$ ) entre las regiones norte y sur ( $F_{st}= 0.070$ ), mientras que las regiones norte y centro presentaron diferenciación baja ( $F_{st}= 0.018$ ). Esto puede deberse al movimiento de material vegetal por acción del hombre en generaciones anteriores o por la distribución espacial en la que se encuentre el material vegetal. Estos factores pueden influenciar la abundancia o falta de flujo genético (Magallán *et al.*, 2009). La diferenciación genética alta entre la región sur con la región norte y centro, también puede deberse a que la región sur, que se encuentra en la llanura costera del pacifico, se encuentra dividida de las otras dos regiones por una cadena montañosa, que presenta vegetación de selva perennifolia, bosque de encino y bosque mesófilo de montaña (INEGI, 2014; Covalada *et al.*, 2016) que impiden el libre flujo de genes entre ellas. Estos resultados concuerdan con el análisis de componentes

principales, donde los árboles del norte y centro se agrupan entre ellos, pero se separan de los de la región del sur. Es importante definir estas agrupaciones, porque como White *et al.* (2007) mencionan, mantener la estructura genética en las poblaciones tiene un valor práctico al planificar las recolecciones de semillas para reproducción y conservación de genes.

La mayor proporción de la variación genética obtenida del análisis de varianza molecular (AMOVA) se encontró dentro de las regiones ( $V= 93.9 \%$ ). Las especies leñosas con apareamiento aleatorio, polinizadas por el viento y de sucesión tardía, tienen niveles de variación más altos dentro de las poblaciones (Hamrick y Godt, 1996).

El análisis bayesiano de asignación de individuos de estructura genética, identificó dos grupos genéticos en las tres regiones de Chiapas, que muestran valores intermedios de ancestría, coincidiendo con el valor de estructura genética moderada. Sin embargo, en el Grupo I (representado por el color rojo), se ubicaron la mayoría de los árboles de la región sur (83%), mientras que en el Grupo II (representado por el color verde), se agruparon los árboles de la región norte y centro. Esta metodología es más precisa, ya que realiza simulaciones de que un individuo pertenezca o no a un grupo genético y, además, no es necesario el número ni distribución de las poblaciones en el estudio para inferir los procesos de migración (Piñero *et al.*, 2008). El dendrograma y análisis de componentes principales (PcoA) generados por las distancias genéticas de Nei, concuerdan con la identificación de dos grupos genéticos por el análisis bayesiano.

## CONCLUSIONES

En el presente estudio se evaluó la diversidad y diferenciación genética en 63 individuos de *Cedrela odorata* L. en tres regiones de Chiapas. La región del norte de Chiapas presentó una mayor diversidad genética. Estos resultados son de importancia para programación de recolectas futuras y proyecto de conservación de los recursos genéticos de la especie, por la fragmentación causada actualmente en su nicho ecológico. La diferenciación genética entre la región norte y sur fue moderada, lo que sugiere un flujo limitado de genes, pero suficiente para evitar la diferenciación entre ellas. Según los valores de  $F_{is}$  y  $F_{it}$ , las regiones presentaron una deficiencia de heterocigotos (endogamia), lo que puede afectar la capacidad reproductiva o vigor de individuos en las siguientes generaciones. El análisis bayesiano en asignación de individuos generó dos grupos genéticos, al igual que el dendrograma y el PCoA, encontrando estructura genética. Se sugiere el aumento del tamaño de muestra en estudios posteriores para tener una mayor precisión en los resultados y reducir las posibilidades de sesgos.

## DISCUSIÓN GENERAL

### Diversidad genética

La diversidad genética juega muchos papeles en el comportamiento de las especies y estructura de ecosistemas (Pérez *et al.*, 2013). Permite a la especie adaptarse a cambios en su entorno, tanto naturales como antropogénicos. En especies con baja diversidad genética aumenta el riesgo de extinción (Tammone, 2016), más en el entorno de presión antropocéntrica que actualmente existe. Gutiérrez (2003) menciona que, al seleccionar individuos con características fenotípicas superiores para un proyecto de mejoramiento genético, debe asegurarse una base genética amplia y representar la mayor diversidad genética existente, con el objetivo de tener una capacidad de superar desafíos ambientales. En algunos casos una base genética amplia en plantas y la variación del medio ambiente influyen sobre el nivel de ataque de ciertas plagas (Smith *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en las frecuencias alélicas entre grupos de árboles superiores seleccionados para iniciar un programa de mejoramiento genético y los no superiores fueron similares. Aravanopoulos (2018) menciona que al seleccionar germoplasma con rasgos cuantitativos importantes económicamente, podrían resultar con una base genética restringida para las generaciones siguientes, debilitando la adaptación local. En este estudio se observó que los valores de diversidad genética promedio para el grupo de árboles superiores son ligeramente mayores que el de los árboles no superiores.

Siete de los diez alelos más comunes se encontraron en mayor frecuencia en los grupos de árboles no superiores, cinco en el sur y dos en el norte, esto puede tener un impacto negativo a largo plazo en los grupos de árboles superiores, en la herencia de estos alelos hacia generaciones subsecuentes por pérdida de diversidad genética (Aravanopoulos, 2018). A largo plazo, las frecuencias alélicas en los árboles superiores deben monitorearse, para saber el efecto de la selección inicial en los niveles de riqueza alélica. Las diferencias de frecuencias alélicas entre árboles superiores y no superiores pueden deberse al balance entre la deriva genética que se ha provocado al seleccionar y el flujo genético entre los árboles (Eguiarte *et al.*, 2013). Las diferencias de frecuencias entre grupos se adjudican a factores de evolución, como la deriva genética, flujo de genes o selección (White *et al.*, 2007). Un pequeño cambio genético de plantas puede tener grandes consecuencias en las interacciones de especies y el flujo de energía en un

ecosistema (Bailey *et al.*, 2006). El mayor número de alelos privados ( $N^P$ ) se encontró en los árboles superiores del norte ( $N^P= 3$ ). Esto puede ser un reservorio para la especie en adaptación local a cambios ambientales y amortiguador del ataque de plagas o enfermedades a futuro (Romero *et al.*, 2003).

La diversidad genética encontrada en árboles de *Cedrela odorata* de tres regiones de Chiapas fue de  $He= 0.678$ . Este valor fue menor al encontrado en poblaciones de Bolivia ( $He= 0.83$  a  $0.89$ ) utilizando siete marcadores SSR en 81 árboles de cedro en tres sitios (Paredes *et al.* 2019). Hernández *et al.* (2008), analizaron 30 familias de cedro rojo, con seis poblaciones procedentes del norte y seis del centro de Mesoamérica, empleando nueve marcadores SSR. Los autores reportaron un valor promedio de  $He= 0.865$ , sin encontrar diferencias de este valor entre ambas regiones (norte=  $0.870$  y centro=  $0.860$ ). En el presente estudio, en un área menor, se detectaron diferencias en los valores de  $He$  para las tres regiones analizadas (norte=  $0.722$ , centro= $0.694$  y sur=  $0.607$ ). Estas diferencias de valores pueden deberse a la mayor fragmentación de hábitat que se ha ocasionado en la región sur de Chiapas, por el uso excesivo de suelo para ganadería, agricultura, cultivos como pastizal y palma africana. Además, la degradación forestal por establecimiento de cafetales o extracción de madera, en comparación con las otras regiones que aún conservan más de 50 % de su cobertura forestal (Covaleda *et al.*, 2016). La región norte presento el mayor número de alelos privados ( $N^P=4$ ). Estos alelos pueden ser funcionales en adaptación a disturbios ambientales incluidos de plagas como el barrenador de yemas o bien a enfermedades que surgen en el futuro (Yanchuk *et al.*, 2008). Las poblaciones del norte probablemente tengan mayor oportunidad de flujo de genes con poblaciones de los estados colindantes.

### **Estructura genética**

Los valores en los índices de Wright ( $F_{is}$  y  $F_{it}$ ) en los dos análisis de cedro fueron positivos, lo que sugiere presencia de endogamia. Puede ser influenciado por los siguientes factores: por el número limitado de árboles en el estudio (Romero *et al.*, 2003) o por efecto de las fuerzas evolutivas como deriva genética, selección y el flujo de genes limitado dentro de regiones, ocasionando emparentamiento entre individuos (Eguiarte *et al.*, 2013; Piñero *et al.*, 2008). Esto pueden ocasionar un efecto negativo en la capacidad reproductiva, supervivencia, y crecimiento



de los árboles en las siguientes generaciones (Pico y Quintana, 2005; Quiroz-Vázquez *et al.*, 2017). Además, las poblaciones naturales de esta especie se encuentran relativamente fragmentadas, actualmente en la categoría de protección especial (SEMARNAT, 2010). Además, la composición de edades ha cambiado a árboles más juveniles, lo que limita la producción de polen en una población). La pérdida de la superficie de hábitat disminuye la densidad regional de las especies. Esta tendencia aumenta el riesgo de que alcance un umbral por debajo del cual ya no sean viables (Santos y Telleria, 2006).

El valor de  $F_{st}$  promedio sugiere una diferenciación genética moderada entre regiones. Esto concuerda con el valor de  $N_m$  obtenido en el estudio. Patiño *et al.* (2008) indican que cuando el  $N_m$  es menor a 1, se puede decir que la deriva genética actúa independientemente en cada una de las poblaciones. Eguiarte *et al.* (2013) mencionan que cuando  $N_m$  es mayor a 1 en cada generación es suficiente para debilitar la diferenciación genética, ya que entre mayor sea el flujo, más parecidas serán las poblaciones. El coeficiente de diferenciación genética por regiones fue variado, presentando una diferenciación genética alta significativa ( $p=0.001$ ) entre las regiones norte y sur ( $F_{st}= 0.070$ ), mientras que entre la región norte y centro la diferenciación fue baja ( $F_{st}= 0.018$ ). Esto puede deberse, al movimiento de material vegetal por acción del hombre en generaciones anteriores o por la distribución espacial en la que se encuentre el material vegetal. Estos factores pueden influenciar la abundancia o falta de flujo genético (Magallán *et al.*, 2009).

La mayor proporción de la variación genética con ayuda del análisis de varianza molecular (AMOVA) en los dos estudios analizados, se encontró dentro de las regiones. Las especies leñosas con apareamiento aleatorio, polinizadas por el viento y de sucesión tardía, experimentan niveles de variación más altos dentro de las poblaciones (Hamrick y Godt, 1996). El análisis bayesiano de asignación de individuos de estructura genética, en los grupos de árboles superiores y los no superiores identifico tres grupos genéticos. En este primer análisis agrupa los grupos de AS y AnS del norte en un mismo grupo genético, mientras que los Grupos AS y AnS del sur fueron separados en dos diferentes grupos genéticos. En el análisis de las tres regiones identifico dos grupos genéticos. Separando los árboles de la región sur (un grupo genético) de los del norte y centro. White *et al.* (2007) mencionan que mantener estructura genética en las poblaciones, tiene un valor práctico al planificar las colecciones de semillas para reproducción y conservación de genes.

## CONCLUSIONES GENERALES

Se evaluaron grupos de árboles superiores con los no superiores de *Cedrela odorata* L. del norte y sur del estado de Chiapas (cuatro grupos). Se encontró un nivel elevado de diversidad genética comparado al reportado por otros autores. Con los marcadores evaluados no se detectó pérdida de diversidad genética al seleccionar árboles superiores para un programa de mejoramiento genético, en comparación con los árboles no superiores.

No existió diferenciación genética entre los árboles superiores y los no superiores, pero sí una diferenciación geográfica entre los grupos de árboles del norte y del sur. Se encontró estructura genética, con tres grupos genéticos ancestrales representados en los árboles muestreados.

Posteriormente se evaluó la diversidad y diferenciación genética en 63 individuos de *Cedrela odorata* L. en tres regiones de Chiapas. La región del norte de Chiapas presentó una mayor diversidad genética. Estos resultados son de importancia para definir la estrategia de recolectas futuras de germoplasma y proyectos de conservación de los recursos genéticos de la especie, por la fragmentación causada actualmente en su nicho ecológico.

La diferenciación genética entre la región norte y sur fue moderada, asociada a un flujo limitado de genes entre ellas. De acuerdo con los valores de  $F_{is}$  y  $F_{it}$ , las regiones presentaron una deficiencia de heterocigotos (endogamia), lo cual puede afectar la capacidad reproductiva y vigor de individuos en las siguientes generaciones. El análisis bayesiano en asignación de individuos generó dos grupos genéticos, al igual que el dendrograma y el PCoA, mostrando una estructura genética regional en los individuos muestreados.

## LITERATURA CITADA

- Aguirre M., A. C. 2017. Patrones de distribución y estructura genética de *Cedrela odorata* y *Albizia saman* para la conservación y restauración ecológica de bosques seco tropical en Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Valle del Cauca, Colombia. 116 p.
- Alfonso-Corrado C., J. Campos-Contreras, G. Sánchez-García, A. Monsalvo-Reyes y R. Clark-Tapia. 2014. Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula*. *Madera y Bosques* 20(2): 11-22.
- Alía, R., D. Agúndez, N. Alba, S. C. González Martínez y A. Soto. 2003. Variabilidad genética y gestión forestal. *Ecosistemas* 12(3): 1-7. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54012307>.
- Aranguren-Méndez, J. A., R. Román-Bravo, W. Isea, Y. Villasmill y J. Jordana. 2005. Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13: 1-6. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/239931374>
- Apolinar H., M. M. 2011. Generación de un vector para la transformación genética de cloroplastos en cedro rojo (*Cedrela odorata* L.). Tesis de maestría en ciencias biológicas. Centro de investigación científica de Yucatán en México. 120 pp.
- Aravanopoulos, F. A. 2018. Do Silviculture and Forest Management Affect the Genetic Diversity and Structure of Long-Impacted Forest Tree Populations? *Forest* 9: 1-14. Doi: 10.3390/f9060355
- Araya, E., O. Murillo, G. Aguilar y O. Rocha. 2005. Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal. *Revista Forestal* 2 (6):1-14.
- Barrance, A., J. Beer, D. H. Boshier, J. Chamberlain, J. Cordero, G. Detlefsen, B. Finegan, G. Galloway, M. Gómez, J. Gordon, G. Hands, G. Hellin, C. Hughes, M. Ibrahim, R. Leakey, F. Mesén, M. Montero, C. Rivas, E. Somarriba y J. Stewart. 2005. Descripciones de especies de árboles nativos de América Central; (Árboles de Centroamérica un Manual para el Extensionista). *Árbol de Cedro*. Costa Rica. pp: 447-452. <http://www.fundesyram.info/biblioteca.php?id=2374>.
- Becerra V., V. y M. Paredes C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica (Chile)* 60: 270-281.
- Caballero D., M. 2010. La verdadera cosecha maderable en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 1: 5-16.
- Callizaya-Cazarani, R. 2003. Injertación en *Swietenia macrophylla* King y *Cedrela odorata* L. mediante la utilización de dos técnicas, realizado en el "Jardín Botánico Lancetilla". Tela,

- Honduras. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de ciencias forestales. Siguatepeque, Honduras. 104 p.
- Cavers, S., C. Navarro and A. Lowe. 2003a. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics* 4: 571–580. Doi: 10.1023/A.
- Cavers, S., C. Navarro and A. J. Lowe. 2003b. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12: 1451–1460. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01810.x
- Cavers S., A. Telford, F. Arenal-Cruz, A J. Pérez-Castañeda, R. Valencia, C. Navarro, A. Buonamili, A. J. Lowe and G. G. Vendramin. 2013. Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography* 40:732–746. Doi: 10.1111/jbi.12086.
- Cayuela, L. 2006. Deforestación y fragmentación de bosques tropicales montanos en los Altos de Chiapas, México. Efectos sobre la diversidad de árboles. *Ecosistemas* 15: 192-198. <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?Id=438>.
- Cintron, M. B. 1990. *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. In: R. M. Burns and B. H. Honkala, Barbara (eds.). *Silvics of North America: 2. Hardwoods*. Agricultural Handbook 654. USDA, Forest Service. Washington, DC. pp: 250-257.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2013. *Cedrela odorata* L. Recuperado de: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info\\_especies/arboles/doctos/36-melia2m.pdf](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/36-melia2m.pdf)
- Covaleda, S., F. Paz y A. Ranero. 2016. Carbono edáfico en Chiapas: planteamiento de políticas públicas de mitigación de emisiones. *Terra Latinoamericana* 34: 97-112.
- Daquinta M., M. Cid, Y. Lezcano, D. Piña y R. Rodríguez. 2004. Formación de callos a partir de inflorescencias inmaduras en Cedro y Caoba híbrida. *Bioteología Vegetal* 4(2): 121 – 124.
- De la Torre, A. 2013. Estructura poblacional, diversidad y flujo genético en poblaciones ribereñas de cedro (*Cedrela odorata* L.). In: C. López-Bonilla y J. Cornelius. *El Bosque - Poblaciones ribereñas de cedro*. Umea, Suecia. pp 80-97.
- Eguiarte L. E., J. A. Aguirre-Liguori, L. Jardón-Barbolla, E. Aguirre-Planter y V. Souza. 2013. Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16: 42-56.
- Escoffier L. and H. Lischer 2010. Arlequin suite Ver 3.5: A new series of programs to perform population genetic analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resource* 10: 564-567.

- Espitia-Camacho, M., H. Aramendiz-Tatis y C. Cardona-Ayala .2017. Características morfológicas, anatómicas y viabilidad de semillas de *Cedrela odorata* L. y *Cariniana pyriformis* Miers. Colombia. Agronomía Mesoamericana 28: 605-617. Doi: 10.15517/ma.v28i3.26287.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Molecular Ecology 4: 2611–2620.
- Galán L., R., H. M. de los Santos P. y J. I. Valdez H. 2008. Crecimiento y rendimiento de *Cedrela odorata* L. y *Tabebuia donnell-smithii* Rose en San José Chacalapa, Pochutla, Oaxaca. Madera y Bosques 14(2): 65-82.
- Gallo L. A., P. Marchelli, M. M. Azpilicueta y P. Crego. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. Bosque 27: 3-15.
- Gandara F. B., E. V. Tambarussi, A. M. Sebbenn, E. M. Ferraz, M. A. Moreno, A. Y. Ciampi, R. P. Vianello, D. Grattapaglia and P. Y. Kageyama. 2014. Development and characterization of microsatellite loci for *Cedrela fissilis* Vell (Meliaceae), an endangered tropical tree species. Silvae Genetica 63 (5): 240-243. Doi: 10.1515/sg-2014-0031.
- Gómez-Díaz J. D., A. I. Monterroso-Rivas y J. A. Tinoco-Rueda. 2007. Distribución del cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) en el estado de Hidalgo, bajo condiciones actuales y escenarios de cambio climático. Madera y Bosques 13(2): 29-49.
- González, E. G. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. Graellsia 59: 377-388.
- Gurrutxaga V., M. y P. J. Lozano V. 2006. Efectos de la fragmentación de hábitats y pérdida de conectividad ecológica dentro de la dinámica territorial. Revista de Geografía 16: 35-54.
- Gutiérrez, B. 2003. Mejoramiento genético y conservación de recursos forestales nativos en Chile. Investigación agraria. Sistemas y Recursos Forestales 12 (3): 145-153.
- Gutiérrez-Vázquez, B. N. y A. Flores-Montaño. 2017. Rodales semilleros: Opción para la conservación in situ de recursos genéticos forestales en Chiapas, México. Foresta Veracruzana 19 (2): 1-16.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, and S. L. Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. New Forest 6: 95-124.
- Hamrick, J. L., and M. J. W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical transactions of The Royal Society B. B 351: 1291–1298.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 2007. Principles of Population Genetics, 4th ed; Sinauer Associates Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 651 p.

- Hernandez G., A. Buonamici, K. Walker, G. Vendramin, G. Navarro y S. Cavers. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *C. odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. Technical Note. Conservation Genetic 9: 459-475.
- Hernández R., J., R. Reynoso S., A. Hernández R., X. García C., E. Hernández-Máximo, J. V. Cob U. y D. Sumano L. 2018. Distribución histórica, actual y futura de *Cedrela odorata* en México. Acta Botanica Mexicana 124: 117-134. Doi: 10.21829/abm124.2018.1305
- Hodge, G. R. and T. L. White. 1993. Advanced-generation wind-pollinated seed orchard design. New Forests 7: 213-236.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2014. Datos vectoriales de la carta de uso de suelo y vegetación. Escala 1: 250,000. Serie V. Encontrado en línea:[http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/wpcontent/uploads/downloads/productosdgi/CIGECH/GeoMA/cigech\\_geo\\_medioamb.html](http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/home/wpcontent/uploads/downloads/productosdgi/CIGECH/GeoMA/cigech_geo_medioamb.html).
- Kremer A., H. Caron, S. Cavers, N. Colpaert, G. Gheysen, R. Gribel, M. Lemes, A. J. Lowe, R. Margis, C. Navarro and F. Salgueiro. 2005. Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. Heredity .95: 274–280.
- Lemes, M. R., R. P. Brondani and D. Grattapaglia. 2002. Multiplexed Systems of Microsatellite Markers for Genetic Analysis of Mahogany, *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae), a Threatened Neotropical Timber Species. The Journal of Heredity 93(4): 287-201.
- Lemes, M. R., R. Gribel, J. Proctor and D. Grattapaglia. 2003. Population genetic structure of mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) across the Brazilian Amazon, based on variation at microsatellite loci: implications for conservation. Molecular Ecology 12: 2875-2883. Doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01950.x.
- Leshner-Gordillo, J. M., J. L. Martínez-Sánchez., P. Orduña-Rodas. y A. I. Hernández-Carreta. 2018. Genetic diversity of the red cedar (*Cedrela odorata*) in the state of Tabasco, México. Bosque 39(3): 411-417. Doi: 10.4067/S0717-92002018000300411.
- Lise, Y., Z. Kaya, F. Isik, R. Sabuncu, I. Kandemir and S. Önde. 2007. The impact of over-exploitation on the genetic structure of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) populations determined by RADP markers. Silva Fennica 41: 211–220. Doi: 10.14214/sf.291
- Loo, J. 2004. Manejo de Germoplasma en Programas de Mejoramiento de Árboles. In Vargas H., J. J., B. Bermejo V. y F. T. Ledig. (Ed). Manejo de Recursos Genéticos Forestales (pp. 45-57). Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco.
- Lowe, A. J., B. Jourde, P. Breyne, N. Colpaert, C. Navarro, J. Wilson and S. Cavers. 2003. Fine-scale genetic structure and gene flow within Costa Rican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*). Heredity 90: 268-275.

- Magallán H., F., M. Martínez, L. Hernández S. y K. Oyama. 2009. Estructura genética de poblaciones de *Eriocaulon bilobatum* (Eriocaulaceae): una especie amenazada de humedades temporales. Bol.Soc.Bot.Méx. 85: 81-88.
- Maldonado B. M. 2016. Propagación vegetativa de cedro (*Cedrela odorata* L.) usando estaquillas y fitoreguladores enraizante en tingo maría. Universidad Agraria de la Selva. Encontrado en: <http://www.unas.edu.pe/web/content/propagaci%C3%B3n-vegetativa-de-cedro-cedrela-odorata-l-usando-estaquillas-y-fitoreguladores>.
- Mariscal L., S. R. 2014. Estudios de variabilidad molecular y fotoquímica de *Cedrela odorata* L. cultivada. Tesis de doctorado. Instituto Politécnico Nacional. Victoria de Durando, Durango. p 147 p.
- Márquez R., J., U. Xotla V. y J. E. González T. 2005. Estudio de germinación y crecimiento inicial de plántulas de *Cedrela odorata* L. Foresta Veracruzana 7: 45-52.
- Muñoz-Muga, P., H. Romo, C. Calderón, O. Evrard y H. Díaz. 2018. Amplificación del gen rbcL revela primer registro de *Porphyra mumfordii* (Bangiales, Rhodophyta) en la bahía de Valparaíso, Chile central. Revista de Biología Marina y Oceanografía 53: 131-140.
- Navarro C., S. Ward and M. Hernández. 2002. The tree *Cedrela odorata* (Meliaceae): A morphologically subdivided species in Costa Rica. Revista Biología Tropical 50(1): 21-29.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. Am. Nat. 106: 283-291
- Nei, M., and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceedings of the National Academy of Sciences 76(10): 5269-5273. Doi: 10.1073/pnas.76.10.5269
- Novick, R. R., C.W. Dick, M. R. Lemes, C. Navarro, A. Caccone, E. Bermingham. 2003. Genetic Structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. Molecular Ecology 12: 2885-2893.
- Oliveira E., J. Gómez P., M. Imaculada Z., R. Vencovsky y M. Carneiro V. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. Genetics and Molecular Biology 29: 294-307.
- Paredes K., G. Arjen, I. Laros, J. Bovenschen, F. Bongers and P. A. Zuidema. 2019. Genetic differences among *Cedrela odorata* sites in Bolivia provide limited potential for fine-scale timber tracing. Tree Genetics & Genomes 15(33): 1-11. Doi: [10.1007/s11295-019-1339-4](https://doi.org/10.1007/s11295-019-1339-4)
- Patiño, F. 1997. Recursos genéticos de Swietenia y Cedrela en los neotrópicos. Propuestas para acciones coordinadas. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)-Dirección de recursos forestales departamento de montes. Roma, Italia. 58 pp.

- Peakall R. and P. E. Smouse. 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in excel. Ppopulation genetic software for teaching and research. *Bioinformatics* 28(19): 2537–2539. Doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.
- Pennington, T. D. y J. Sarukhán. 2005. Árboles tropicales de México. México. Manual para la identificación de principales especies. 3ra. Ed. UNAM-FCE. 523 p.
- Peña R., Y. J., J. A. González R., J. Juárez G., A. Domínguez H., L. Gómez L., F. Sánchez T. y M. L. Robert. 2006. Propagación *in vitro* de cedro rojo (*Cedrela odorata* L. [Meliaceae]) y caoba (*Swietenia macrophylla* King. [Meliaceae]) mediante embriogénesis somática y organogénesis empleando biorreactores BIOMINT®. Instituto Tecnológico Superior de Acayucan. Mérida, Yucatán.
- Pérez L., G., A. González-Rodríguez, O. Ken y P. Cuevas-Reyes. 2013. Importancia de la diversidad genética sobre la defensa química de plantas y las comunidades de herbívoros. *Biológicas* 15(2): 1-8.
- Picó F. X. y P. F. Quintana-Ascencio. 2005. Análisis de factores demográficos y genéticos para la conservación de poblaciones de plantas en un hábitat fragmentados. *Ecosistemas* 14: 109-115.
- Piñero, D., A. Barahona, L Eguiarte, A. Rocha O., R. Salas L. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. pp: 415-435.
- Piotti, A. 2009. The genetic consequences of habitat fragmentation: the case of forests. *Forest* 2: 75-76. Doi: 10.3832/for0496-002.
- Pritchard, J.K.; M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*.155: 945–959.
- Quiroz-Vázquez, R. I., J. López-Upton, V. M. Cetina-Alcalá y G. Ángeles-Pérez. 2017. Capacidad reproductiva de *Pinus pinceana* Gordon en el límite sur de su distribución natural. *Agrociencia* 51: 91-104.
- Ramírez-García C., G. Vera-Castillo, F. Carrillo-Anzures y O. S. Magaña-Torres. 2008. El cedro rojo (*Cedrela odorata* L.) como alternativa de reconversión en terrenos abandonados por la agricultura comercial en el sur de Tamaulipas. *Agricultura Técnica en México* 34: 243-250.
- Rivera D. y P. Lowy. 2006. Reintroducción y propagación de especies maderables estudio de caso “caoba” *Swietenia macrophylla* King y “cedro” *Cedrela odorata* L. en la isla de San Andrés. Universidad Nacional de Colombia. 25 p.



- Rojas-Rodríguez F. y G. Torres-Cordova. 2013. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción Cedro amargo (*Cedrela odorata* L.). Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Costa Rica) 11(26): 25-27.
- Romero, C., A. Pedryc, V. Muñoz, G. Llácer and M. Badenes, M. 2003. Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. Genome 46: 244-252.
- Romero, C. 2009. Identificación de marcadores microsátélites. Análisis e interpretación de resultados. In: Prácticas de Biodiversidad y Marcadores Moleculares. B. Picó and M.J. Díez (eds.) Editorial Universidad Politécnica de Valencia. 11 p.
- Saghai-Marooif, M. A, K. M. Soliman, R. A. Jorgensen and R. W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphism in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proceedings of the National Academy of Sciences 81: 8014–8019.
- Salazar, R., D. Roker and L. Schmidt. 2000. *Cedrela odorata* L. (Seed leaflet). Revisado enero 2019. from <http://sl.ku.dk/rapporter/seed-leaflets/filer/cedrela-odorata-20.pdf>
- Sampayo-Maldonado S., M. Jiménez-Casas, J. López-Upton, V. Sánchez-Monsalvo, J. Jasso-Mata, A. Equihua-Martínez y C. R. Castillo-Martínez. 2016. Enraizado de miniestacas de *Cedrela odorata* L. Agrociencia 50: 919-929.
- Sanguinetti, C. J, E. Dias-Neto and A. J. Simpson. 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. Biotechniques 17(5): 914-921.
- Santos, T. y J. L. Telleria. 2006. Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. Ecosistemas 15: 3-12.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, MX). 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059. Protección ambiental - Lista de especies en riesgo. 78 p.
- SIRE. 2012. *Cedrela odorata* L. Paquetes Tecnológicos. Recuperado de: <http://www.conafor.gob.mx:8080/documentos/docs/13/898Cedrela%20odorata.pdf>
- Smith, D. S., J. K. Bailey, S. M. Shuster and T. G. Whitham. 2011. A geographic mosaic of trophic interactions and selection: trees, aphids and birds. Journal of Evolutionary Biology 24: 422-429. Doi: 10.1111/j.1420-9101.2010.02178.x.
- Soldati, M. C., L. Fornes, M. van Zonneveld, E. Thomas and N. Zelener. 2013. An assessment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. Biochemical Systematics and Ecology 47: 45–55. Doi: 10.1016/j.bse.2012.10.011.
- Soldati, M. C., M. V. Inza, L. Fornes and N. Zelener. 2014. Cross transferability of SSR markers to endangered *Cedrela* species that grow in Argentinean subtropical forests, as a valuable tool for population genetic studies. Biochemical Systematics and Ecology 53: 8–16. Doi: 10.1016/j.bse.2013.12.003

- Tamay D., L., C. Ibarra y C. Velasquillo. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2: 70-78.
- Tammone, M. N. 2016. Pérdida de diversidad genética: implicaciones para la evolución y la conservación de dos especies de *Ctenomys* (*Rodentia*, *Ctenomyidae*) en Patagonia norte.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA 5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology Evolution* 28: 2731–2739. Doi: 10.1093/molbev/msr121.
- Teza V., M. I. Fonseca, L. H. Walantos, P. Dávalos, A. A. Toro, A. E. Cariaga, L. L. Villalba y P. D. Zapata. 2012. Estandarización de marcadores moleculares microsatélites para uso en la industria forestal de misiones, Argentina. *Revista Colombiana Biotecnología* 14(1): 216-223.
- Tijerino-López A. 2008. Determinación de la variabilidad genética en cinco poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L. utilizando la técnica RAPD. Tesis de Licenciatura. León, Nicaragua. 86 p.
- The IUCN Red List of Threatened Species 2013. Available online: <http://www.iucnredlist.org/details/42429/0>.
- White, G. M., D. H. Boshier and W. Powell. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. *Molecular Ecology* 8: 1899-1909.
- White, T. L., T. W. Adams and D. B. Neale. 2007. *Forest Genetics*. CAB International, Oxford. 682 p.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 323-354.
- Yanchuk, A. D., J. C. Murphy and K. F. Wallin. 2008. Evaluation of genetic variation of attack and resistance in lodgepole pine in the early stages of a mountain pine beetle outbreak. *Tree Genetic and Genomes* 4(2): 171-180.