

Guatemala, 26 de febrero, 2021



Señor Director
Dr. Félix Alan Douglas Aguilar Carrera
Director General de Investigación
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señor Director:

Adjunto a la presente el informe final “**Estudio de diversidad genética del cedro nativo guatemalteco y establecimiento de una colección núcleo in vitro**” con número de proyecto B21-2020, coordinado por el Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón y avalado por el Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Este informe final fue elaborado con base en la guía de presentación de la Dirección General de Investigación, el cual fue revisado su contenido en función del protocolo aprobado, por lo que esta unidad de investigación da la aprobación y aval correspondiente.

Así mismo, el coordinador del proyecto, se compromete a dar seguimiento y cumplir con el proceso de revisión y edición establecido por Digi del **informe final y del manuscrito científico**. El manuscrito científico debe enviarse, por el coordinador del proyecto, para publicación al menos en una revista de acceso abierto (*Open Access*) indexada y arbitrada por expertos en el tema investigado.

Sin otro particular, suscribo atentamente.

“Id y enseñad a todos”



Firma

Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón
Coordinador del proyecto de investigación

Firma y sello

Director del Instituto de Investigaciones Agronómicas (IIA)
Facultad de Agronomía

Universidad de San Carlos de Guatemala
Dirección General de Investigación
Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

INFORME FINAL

Estudio de diversidad genética del cedro nativo guatemalteco y establecimiento de una
colección núcleo in vitro

Equipo de investigación

Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón¹

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}

M.Sc. Marie Kalousová²

Ph.D. Sergio Alejandro Melgar Valladares³

Guatemala febrero de 2021

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹

Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología³

Dr. Félix Aguilar Carrera
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. Saúl Guerra Gutiérrez
Coordinador del Programa de Recursos Naturales y Ambiente

Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón¹
Coordinador del Proyecto

Ing. Agr. Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Investigador

M.Sc. José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Investigador

M.Sc. Marie Kalousová²
Investigadora

Ph.D. Sergio Alejandro Melgar Valladares³
Investigador

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences²
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Escuela de Biología³

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación, 2020. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores. Esta investigación fue cofinanciada por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través del Proyecto B21-2020 durante el año 2020 en el Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente. Financiamiento aprobado por Digi: Q.299,019.1 Financiamiento ejecutado: Q.177,019.1

Indice

1	Resumen.....	1
2	Palabras clave.....	1
3	Abstract	2
4	Introducción	3
5	Planteamiento del problema	4
6	Preguntas de investigación.....	5
7	Delimitación en tiempo y espacio	6
8	Marco teórico	6
8.1	Estado de los recursos forestales en Guatemala.....	6
8.2	Descripción de la especie <i>Cedrela odorata</i> L.	7
8.3	Diversidad genética	8
8.4	Factores implicados en la diversidad genética	8
8.5	Marcadores moleculares.....	9
8.6	Marcador molecular de tipo Microsatélite (SSR)	10
9	Estado del arte	10
9.1	Diversidad genética de <i>C. odorata</i>	10
9.2	Conservación del germoplasma bajo condiciones in vitro.....	12
10	Objetivo general	12
11	Objetivos específicos	12
12	Hipótesis.....	12
13	Materiales y métodos	13
13.1	Enfoque y tipo de investigación.....	13
13.2	Recolección de información.....	13
13.3	Técnicas e instrumentos	15
13.4	Procesamiento y análisis de la información	18

14	Vinculación, difusión y divulgación	19
15	Productos, hallazgos, conocimientos o resultados	20
15.1	Describir los niveles de riqueza y diversidad genética de las poblaciones de cedro.....	20
15.2	Describir la estructura genética de las poblaciones de cedro.....	23
15.3	Conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro	30
16	Análisis y discusión de resultados.....	40
17	Conclusiones	43
18	Impacto esperado	43
19	Referencias	44
20	Apéndices.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Ubicación de las poblaciones de <i>Cedrela odorata</i> analizadas en el estudio de estructura y diversidad genética. Identificación de las poblaciones analizadas: PN = Piedras Negras, LCN = Las Cruces Norte, LCC = Las Cruces Centro, LCS = Las Cruces Sur.	14
Figura 2. Número de genotipos analizados en cada población de <i>Cedrela odorata</i>	20
Figura 3. Número de alelos identificados por locus analizado.	21
Figura 4. Comparación de los valores de la heterocigosidad esperada menos la heterocigosidad observada para cada locus analizado.	21
Figura 5. Dendrograma de tipo Neighbour-joining mostrando la relación genética entre las cuatro población de <i>Cedrela odorata</i> basado en la matriz pareada de los valores de F_{st}	24
Figura 6. Dendrograma de tipo Neigbor-Joining (NJ) con arreglo radial generado a partir de 8 marcadores microsatélites que muestra la diversidad genética de los 54 genotipos de <i>Cedrela odorata</i> analizados.....	25

Figura 7. Análisis de coordenadas principales que revela el patrón de agrupación de los 54 individuos de <i>Cedrela odorata</i> . Los puntos representan los individuos de cada población indicada por cada color.....	26
Figura 8. Valores de diagnóstico de L(K) y Delta-K del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de <i>Cedrela odorata</i>	26
Figura 9. Resultados del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de <i>Cedrela odorata</i> para K = 2 y K = 4. Cada individuo está representado por una única barra vertical, que está dividida en grupos de genéticos. Los colores representan grupos genéticos, y los segmentos coloreados muestran la proporción de ancestros estimada del individuo.	27
Figura 10. Análisis discriminante de componentes principales de los 54 genotipos de <i>Cedrela odorata</i> para la identificación de estructura poblacional.	28
Figura 11. Asignación de los genotipos de <i>Cedrela odorata</i> a cada uno de los grupos genéticos inferidos en base al análisis discriminante de componentes principales.....	28
Figura 12. Resultados de la prueba de mantel de correlación espacial luego de 999 permutaciones mediante el método de Monte-Carlo.....	29
Figura 13. Método de aislamiento por distancia entre las distancias geográfica y genética de las poblaciones analizadas.....	29
Figura 14. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de <i>Cedrela odorata</i> establecidos sobre medio MS y WPM. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	30
Figura 15. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de <i>Cedrela odorata</i> establecidas sobre medio WPM con diversas concentraciones de BAP y ANA y en el medio MS con la combinación de 2/3 BAP/ANA respectivamente. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	31
Figura 16. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de <i>Cedrela odorata</i> establecidas sobre medio WPM con diversas concentraciones de BAP e IBA. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	32
Figura 17. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de <i>Cedrela odorata</i> establecidas sobre medio WPM comparando combinaciones de hormonas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.	33

Figura 18. Prueba de Chi cuadrado de los diferentes porcentajes de sorbitol en medio de cultivo MS basal sobre la sobrevivencia de plantas de Cedrela odorata para su conservación in vitro.	34
Figura 19. Prueba de Chi cuadrado del efecto del tiempo en la sobrevivencia de plantas de Cedrela odorata en medio MS basal con diferentes porcentajes de sorbitol para su conservación in vitro.	35
Figura 20. Prueba de Chi cuadrado del efecto de la combinación tiempo y la concentraciones de sorbitol sobre medio de cultivo MS basal en la sobrevivencia de plantas de Cedrela odorata para su conservación in vitro.	36
Figura 21. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de Cedrela odorata en función a los porcentajes de sorbitol suplementados sobre medio de cultivo MS basal. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	37
Figura 22. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de Cedrela odorata establecidas sobre medio MS suplementado con sorbitol en función a las semanas transcurridas desde el establecimiento. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	37
Figura 23. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de Cedrela odorata establecidas sobre medio MS basal en función de cuatro concentraciones de sorbitol y su efecto a lo largo de las semanas transcurridas desde el establecimiento. Clasificación en función a las semanas transcurridas a partir del establecimiento in vitro. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	38
Figura 24. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de Cedrela odorata establecidas sobre medio MS basal en función de cuatro concentraciones de sorbitol y su efecto a lo largo de las semanas transcurridas desde el establecimiento. Clasificación en función a las concentraciones de sorbitol. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$	39

Índice de Tablas

Tabla 1. Detalle de los microsatélites utilizados para el análisis de diversidad genética de <i>Cedrela odorata</i>	16
Tabla 2. Parámetros de diversidad genética del número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), riqueza alélica (A_r) y el coeficiente de consanguinidad (F_{is}) para cada locus.	22
Tabla 3. Parámetros de diversidad genética del número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada no sesgada (uH_e), riqueza alélica (A_r) y el coeficiente de consanguinidad (F_{is}) para cada población. Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$) y ** ($p < .001$).	23
Tabla 4. Matriz de comparación por pares del valor de F_{st} para todas las poblaciones de <i>Cedrela odorata</i> . Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$)	23
Tabla 5. Análisis molecular de varianza de las poblaciones de <i>Cedrela odorata</i> . . Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$), ** ($p < .01$).....	24

1 Resumen

Cedrela odorata L., una de las especies maderables neotropicales más importantes, está amenazada por la deforestación y tala insostenible en muchas partes de su área de distribución natural. La información sobre los patrones de variación genética es útil para la planificación de actividades de reforestación y conservación del recurso fitogenético. Sin embargo, hasta la fecha no se dispone de esta información en Guatemala. En el presente estudio se informa sobre la diversidad genética entre y dentro de las cuatro poblaciones de *C. odorata* ubicadas en la Sierra del Lacandón, al norte de Guatemala, sobre la base de ocho marcadores microsatélites altamente polimórficos, así como su establecimiento en vitro. El nivel de diferenciación genética fue bajo ($F_{st} = 0.022$), indicando un alto flujo genético entre las poblaciones, mientras que la diversidad genética fue alta ($H_e = 0.721$). Sin embargo, se determinó que el nivel de endogamia es significativo ($F_{is} = 0.127$), lo que supone fuertes indicios de erosión genética. El análisis molecular de varianza reveló que solamente el 3% de la variación es debida al efecto entre poblaciones, mientras el 97% de la varianza se encuentra dentro de las poblaciones. Con el medio de cultivo MS suplementado con 4% de sorbitol se obtuvo un 80% de sobrevivencia de plantas a las 20 semanas. Comparado con otros estudios, los niveles de conectividad entre poblaciones, así como el grado de diversidad genética es más alto. Se sugiere mantener los esfuerzos para evitar la reducción poblacional, por deforestación y extracción ilegal, y de esta forma disminuir el constante riesgo de erosión por deriva genética.

2 Palabras clave

endogamia, variabilidad genética, flujo genético, erosión genética

3 Abstract

Cedrela odorata L., one of the most important Neotropical timber species, is threatened by deforestation and unsustainable logging in many parts of its natural range. Information on patterns of genetic variation is useful for planning reforestation and plant genetic resource conservation activities. However, to date, this information is not available in Guatemala. This study reports on genetic diversity between and within the four populations of *C. odorata* located in the Sierra del Lacandón, in northern Guatemala, based on eight highly polymorphic microsatellite markers and the establishment of in vitro conditions. The level of genetic differentiation was low ($F_{st} = 0.022$), indicating high gene flow between populations, while genetic diversity was high ($H_e = 0.721$). However, the inbreeding level was determined to be significant ($F_{st} = 0.127$), which is a strong indication of genetic erosion. Molecular analysis of variance revealed that only 3% of the variation is due to the populations' effect, while 97% of the variance is within populations. With MS medium supplemented with sorbitol 4%, We got an 80% of survival rate. Compared to other studies, levels of connectivity between populations and the degree of genetic diversity are higher. We suggest that efforts be maintained to avoid population reduction through deforestation and illegal extraction, thus reducing the constant risk of erosion due to genetic drift

Key words: inbreeding, genetic variability, gene flow, genetic erosion

4 Introducción

Guatemala es un país reconocido como megadiverso, gracias a su alto índice de diversidad biológica (Consejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP], 2013), sin embargo, esta condición se ve constantemente amenazada por los altos índices de deforestación, los cuales han sido estimados en pérdidas anuales de 48,084 ha de bosques con una tasa de pérdida de 1.5 % anual (Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales [MARN], 2017; Universidad del Valle de Guatemala [UVG] et al., 2011). Las últimas estimaciones reportan que el 51.9% de los bosques guatemaltecos se ubican dentro de áreas protegidas, sin embargo, estas áreas son las que sufren la mayor tasa de deforestación (1.5%), en comparación con áreas no protegidas (0.4%) (INAB, CONAP, UVG y URL, 2012). El proceso de deforestación y extracción ilegal de madera en áreas protegidas, impacta directamente sobre especies de valor comercial como el cedro (*Cedrela odorata* L.).

El cedro es una especie maderable que ha sufrido el proceso de sobreexplotación selectiva, lo que ha impactado directamente en la reducción de sus poblaciones, convirtiéndola en una especie amenazada (Cintrón, 2000; Cordero et al., 2003). Esto conduce a la reducción de la capacidad de adaptación, la disminución de la aptitud reproductiva y la modificación negativa de las frecuencias genotípicas, aumentando la proporción de homocigotos (Frankham et al., 2004; Loo, 2011). La reducción en el tamaño de las poblaciones del cedro, trae consigo la alteración negativa de los patrones de diversidad y estructura genética (Baucom et al., 2005; Davies et al., 2013; Hanson et al., 2008). A medida que el tamaño de las poblaciones naturales de cedro va decreciendo, el riesgo del cruzamiento endogámico aumenta, reduciendo la heterocigosidad y minimizando la diversidad genética (Cordero et al., 2003; Frankham et al., 2004).

La presente investigación ofrecerá una primera aproximación del estado actual del germoplasma de cedro nativo en las áreas de estudio, pudiendo identificar las poblaciones con mayor o menor diversidad genética, así como los sitios de mayor endogamia y erosión genética. La información generada constituirá un valioso instrumento, necesario para futuros planes de conservación, restauración y aprovechamiento sostenible (Gallo et al., 2009). La incorporación del componente genético es fundamental en este tipo de procesos, al mejorar la probabilidad de que los ecosistemas restaurados prosperen y sean autosustentables, pudiendo adaptarse a cambios ambientales y disminuyendo el riesgo al proceso de endogamia (Thomas et al., 2014). Al identificarse las poblaciones con mayor

riqueza genética, se podrán dirigir, de forma eficiente, los esfuerzos para la conservación de estas. Además, la caracterización molecular permitirá obtener datos cualitativos con los cuales se puede justificar, objetivamente, la gestión de recursos para la protección de las áreas de dispersión natural de la especie.

Los objetivos consisten en describir la estructura genética de las poblaciones de cedro, determinar los niveles de riqueza y diversidad genética de las mismas y conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones *in vitro*. Para lograr dichos objetivos, se realizaron colectas dentro del parque Sierra del Lacandón. El estudio de diversidad genética se realizó utilizando ocho microsatélites nucleares diseñados para cedro (Hernández et al., 2008) y la lectura de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante electroforesis capilar. Para el procesamiento de la información, se emplearon programas especialmente diseñados para el análisis de datos moleculares como GenAlEx 6.5.1 (Excoffier et al., 1992), FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995), el paquete ade4 (Bougeard & Dray, 2018), STRUCTURE 2.3.4 y CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007). Con la información generada del análisis de diversidad genética, se estableció una colección núcleo bajo condiciones *in vitro*. Para ello, se desarrolló un ensayo de establecimiento *in vitro*, evaluando diferentes niveles de fitohormonas y sorbitol sobre los medios basales MS y WPM. Los resultados de este ensayo se analizarán a través de un análisis de varianza y una posterior prueba de comparación de medias, determinando así, la formulación con mejores resultados en el establecimiento y conservación *in vitro* del germoplasma de cedro nativo.

5 Planteamiento del problema

A nivel mundial, Guatemala se encuentra dentro del destacado grupo de países megadiversos, al reconocerse que posee el 70 % de la diversidad biológica global. Además, el país cuenta con el 40 % del total de especies endémicas de Mesoamérica (CONAP, 2013), dentro de las cuales se encuentra el cedro, una especie de alto valor comercial por la demanda de su madera. Esta diversidad biológica se ve constantemente amenazada por la deforestación y extracción ilegal de madera. Los últimos reportes para el país, por parte del Informe Ambiental del Estado de Guatemala y el Mapa de Cobertura forestal 2001-2006, indican que la deforestación ha ido en aumento en los últimos años, presentándose una pérdida anual de 48,084 ha, a una tasa de deforestación de 1.5 %, estableciéndose una pérdida bruta de 101,852 ha/año (MARN, 2017; UVG et al, 2011).

Como resultado de los procesos de reducción poblacional, se presenta la alteración de los patrones de diversidad y estructura genética (Baucom et al., 2005; Davies et al., 2013; Hanson et al., 2008). Además, poblaciones de tamaños reducidos, tienden a presentar un alto cruzamiento endogámico, lo que reduce los niveles de heterocigosidad y minimiza la diversidad genética (Cordero et al., 2003; Frankham et al., 2004). El cedro es una especie maderable que ha sufrido el proceso de sobreexplotación selectiva, lo que ha impactado directamente en la reducción de sus poblaciones, convirtiéndola en una especie amenazada (Cintrón, 2000; Cordero et al., 2003). Esto conduce a la reducción de la capacidad de adaptación, la disminución de la aptitud reproductiva y la modificación negativa de las frecuencias genotípicas, aumentando la proporción de homocigotos (Frankham et al., 2004; Loo, 2011). Debido a la presión que sufre la especie, la presencia de estos árboles en bosques naturales es escasa, localizándose la mayor parte de ellos en asociación con sistemas agroforestales, lo que fomenta aún más el proceso de erosión genética (Almendarez et al., 2013; Esquivel et al., 2009; Navarro et al., 2004).

Este estudio ayudará a identificar las poblaciones con alta o baja diversidad genética y los sitios de mayor endogamia. Esta información será un valioso instrumento para futuros planes de conservación, restauración y aprovechamiento sostenible. (Gallo et al., 2009). La incorporación del componente genético es fundamental en este tipo de procesos, al mejorar la probabilidad de que los ecosistemas restaurados prosperen y sean autosustentables, pudiendo adaptarse a cambios ambientales y disminuyendo el riesgo al proceso de endogamia (Thomas et al., 2014). La conservación bajo condiciones in vitro, garantiza la protección del germoplasma nativo de cedro, el cual será la pieza fundamental para futuros programas de mejoramiento genético. Bajo estas condiciones, se puede lograr la propagación masiva para efectos de restauración en áreas de dispersión natural o el establecimiento de plantaciones comerciales de alta calidad genética.

6 Preguntas de investigación

General

1. ¿Cuál es la variabilidad genética de las poblaciones de cedro ubicadas en las áreas de la Sierra del Lacandón y la Sierra de las Minas?

Específicas

1. ¿Cómo es la estructura genética de las poblaciones de cedro bajo estudio?
2. ¿Cuál de las poblaciones analizadas presenta mayor diversidad genética?

3. ¿Cómo puede establecerse una colección núcleo con los individuos genéticamente más diversos sin la utilización de semilla botánica?

7 Delimitación en tiempo y espacio

La investigación se realizó durante el periodo comprendido de febrero a diciembre del año 2020 constando de tres fases: campo, laboratorio y gabinete. En la fase de campo se realizó la colecta de materiales de cedro en la zona intangible del Parque Nacional Sierra de Lacandón, específicamente en los municipios de La Libertad y las Cruces del departamento de Petén durante los meses de febrero hasta mayo.

Durante el mes de junio hasta noviembre se realizó la fase de laboratorio, en la cual se llevó a cabo la estandarización y desarrollo de los protocolos de extracción de ADN, así como el marcador molecular y la estandarización del protocolo para establecimiento in vitro. En los dos meses finales se elaboraron y presentaron el informe final y el manuscrito científico. La fase de laboratorio y gabinete se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía y el laboratorio de Biología Molecular de la Faculty of Tropical AgriSciences, Czech University of Life Sciences, Prague. Dicha institución extranjera ha manifestado su compromiso de cooperación, al reconocer la importancia que representa la caracterización molecular y conservación in vitro de un recurso fitogenético tan valioso, como lo es el cedro nativo de Guatemala

8 Marco teórico

8.1 Estado de los recursos forestales en Guatemala

A nivel mundial, año con año se degradan extensas áreas de bosque. Según las estimaciones, entre el periodo 2010 - 2015 hubo una pérdida neta, entre bosques primarios y regenerados de forma natural (bosque primario), de 6.6 millones de hectáreas anuales (FAO, 2015). En Guatemala, se estimaba que para el año 2006, la cobertura forestal alcanzaba 3.87 millones de hectáreas, mientras que para el año 2010 la cobertura descendió a 3.72 millones de hectáreas. De la cobertura forestal reportada al 2010 en Guatemala, 1.94 millones de hectáreas se ubicaban en áreas protegidas (INAB, CONAP, UVG y URL, 2012). En cuanto a la tasa de deforestación, se estimó en 132,137 hectáreas anuales para el periodo 2006-2010, con una tasa de disminución del inventario forestal de 1.00% anual en los últimos cuatro años (IARNA, 2012). Para el 2010, dentro de las

áreas protegidas se encontraba el 51.9% de los bosques del país, mientras que el restante 48.1% estaba fuera de estas.

Esto resalta la importancia de la conservación de las áreas protegidas, ya que, sin estas, probablemente la cobertura forestal del país fuera aún menor a la actual (INAB, CONAP, UVG y URL, 2012). A pesar de ello, la presión sobre los bosques dentro de estas áreas, también han causado la reducción en los bosques. En el periodo 2006 - 2010 hubo una reducción de 33, 322 hectáreas anuales con una tasa de deforestación del 1.5%. Para el mismo periodo, la pérdida de bosque fuera de áreas protegidas fue de 8,127 hectáreas con una tasa anual de deforestación de 0.4%. Esta diferencia es debida a que muchos de los bosques fuera de áreas protegidas se encuentran en áreas poco deseables para el cambio hacia usos agrícolas y/o agroindustriales (ENDDBG, 2017). Esta reducción abrupta dentro de las áreas protegidas, trae consigo el riesgo de la pérdida de diversidad genética de especies forestales localizadas dentro de estas, tal sea el caso del cedro.

8.2 Descripción de la especie *Cedrela odorata* L.

El cedro es una especie perteneciente a la familia Meliaceae nativa de Centroamérica. Dicha especie presenta hojas lenticeladas, paripinadas y algunas veces imparipinadas con 6 a 12 pares de folíolos. Las inflorescencias se presentan en forma de panículas de 20-40 cm de largo con flores con un fuerte aroma a ajo. En cuanto a la corteza, es fisurada de forma longitudinal y puede alcanzar hasta 55 m de altura y 1.5 m de diámetro (Zamora, 2002). La fenología varía en función de la región geográfica. Generalmente, los frutos se producen entre febrero y abril (Cordero et al., 2003). La especie se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina, incluyendo algunas islas del Caribe, desde una altitud de 0 msnm hasta 800 msnm (Rojas-Rodríguez & Torres-Córdoba, 2013). Se establece en áreas con 1200 a 3000 mm de precipitación anual, prefiriendo climas estacionalmente secos con suelos bien drenados y derivados de piedra caliza (Cintrón, 2000).

La especie *C. odorata* L. se encuentra en el apéndice II de la lista de CITES (Muellner et al., 2009). Por causa de la sobreexplotación, el avance de la frontera agrícola, la explotación selectiva y la deforestación, se han causado reducciones significativas en el tamaño poblacional, haciendo cada vez más difícil la identificación de individuos en condiciones naturales (Almendarez et al., 2013; Navarro et al., 2004)

8.3 Diversidad genética

Esta puede ser definida como la variedad de alelos y genotipos diferentes en una población, una especie o grupo de especies, siendo la expresión de estas variaciones de tipo morfológico, fisiológico o no presentarse manifestación fenotípica, siendo la variación a nivel de genes no codificantes en el ADN (Frankham et al., 2004; Young et al., 1996). El conocimiento y la aplicabilidad de la diversidad genética se relaciona con la mejora de planes de manejo y procesos de restauración, lo que incrementa la capacidad de adaptación de las plántulas y autosostenibilidad de las poblaciones reforestadas (Thomas et al., 2014).

La erosión genética incrementa su riesgo cuando las poblaciones presentan tamaños poblacionales pequeños, principalmente por la intensificación de la endogamia y deriva genética (Ellstrand & Elam, 1993). Por tal razón, las especies amenazadas o en peligro de extinción, suelen presentar menor diversidad genética en comparación a especies no amenazadas (Frankham et al., 2004). Para fines de restauración forestal, se sugiere la selección de germoplasma con alta diversidad genética, debido a que, la introducción de semillas con baja diversidad genética, tiende a provocar una reducción de la capacidad adaptativa en la población (Thomas et al., 2014).

La diversidad genética de una población es generalmente expresada en términos de riqueza alélica y diversidad genética, la cual mantiene relación con el grado de heterocigosidad de la población, ya sea heterocigosidad esperada (H_e) u observada (H_o). La H_e puede ser entendida como la cantidad promedio de individuos heterocigotos que deberían estar presentes en una población bajo equilibrio de Hardy-Weinberg. La H_o se expresa como el promedio del conteo directo de los individuos heterocigotos dentro de una población (Frankham et al., 2004). La estructura genética poblacional mide el grado de divergencia que se presenta entre las poblaciones y se calcula por medio del análisis de varianza molecular (AMOVA). Este se expresa por medio de un coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) (Peakall & Smouse, 2015). El valor de F_{st} puede indicar una diferencia alta ($F_{st} > 0,25$), media ($F_{st} = 0,15-0,25$), baja o poco significativa ($F_{st} < 0,05$) (Wright, 1965).

8.4 Factores implicados en la diversidad genética

Los cambios evolutivos en las especies vienen dados por variaciones en las frecuencias alélicas debido a factores como las mutaciones, el flujo genético y la selección

natural (Curtis et al., 2006). El estudio del ADN, mediante marcadores moleculares, permite comprender la variación genética a nivel de poblaciones y especies que se presenta por efecto de la deriva y el flujo genético. Conceptualmente, las mutaciones son variantes en los alelos o cromosomas, constituyendo el origen de toda la diversidad genética. Muchas de las variantes pueden ser el resultado de errores en el proceso de replicación del ADN, pero también se suman elementos genéticos móviles, ruturas cromosómicas y otros (Frankham et al., 2004). El flujo genético es entendido como el movimiento de genes entre poblaciones, el cual se ve afectado por la fragmentación y aislamiento de individuos o poblaciones (Nora et al., 2011).

La selección natural se relaciona con la tasa de natalidad y reproducción que se ve afectada por factores ambientales. La supervivencia de los genotipos produce cambios evolutivos que llevan a la adaptación de nuevas condiciones bióticas y abióticas. Este proceso determina los genotipos con mayor probabilidad de adaptarse y por consiguiente, los alelos con mayor frecuencia en la población (Frankham et al., 2004). La deriva genética son cambios en la composición genética de una población como resultado del muestreo al azar en poblaciones pequeñas. Sus efectos son la pérdida de diversidad genética y la divergencia entre poblaciones (Cabrero & Camacho, 2002)

8.5 Marcadores moleculares

Un marcador genético es definido como un gen o una secuencia de ADN con una ubicación conocida dentro de un cromosoma y asociado con genes particulares o rasgos. También puede ser descrito como una variación debida a una mutación o alteración genómica en los loci que puede ser observada. Un marcador genético puede ser una secuencia corta de ADN como un nucleótido de polimorfismo simple, o bien, secuencias más extensas como los mini y microsátélites (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015). El desarrollo y uso de los marcadores moleculares para la detección de polimorfismos en el ADN es uno de los avances más significativos en el campo de la genética molecular.

La diferencia en los principios de cada marcador molecular, así como sus metodologías y aplicaciones requiere una cuidadosa consideración al momento de optar por uno o varios de ellos. Algunos de los marcadores ampliamente utilizados son restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD), amplified fragment length polymorphism (AFLP), inter-simple sequence repeats (ISSRs), sequence characterized regions (SCARs), sequence tag sites (STSs),

cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS), microsatellites or simple sequence repeats (SSRs), expressed sequence tags (ESTs), single nucleotide polymorphisms (SNPs), y diversity arrays technology (DArT) (Semagn et al., 2006).

Desde su desarrollo, estos han sido constantemente modificados para mejorar su utilidad en la análisis genómico, filogenético, diversidad genética y localización de genes objetivo. Existen numerosos reportes sobre las ventajas de este tipo de marcadores sobre la caracterización morfológica debido a la objetividad del análisis (Jonah et al., 2011).

8.6 Marcador molecular de tipo Microsatélite (SSR)

Los microsatélites (de 1 a 10 nucleótidos) y minisatélites (> 10 nucleótidos) son subcategorías de repeticiones en tándem (TR) que, junto con las repeticiones intercaladas predominantes (o restos de elementos transponibles), conforman regiones repetitivas genómicas. Las repeticiones en tándem son evolucionariamente relevantes debido a su inestabilidad. Estas mutan en rangos de entre 10^3 y 10^6 por cada generación celular (Gemayel et al., 2012). Los microsatélites se encuentran en procariotas y eucariotas.

Estos se presentan ampliamente distribuidos a través del genoma, especialmente en la eucromatina de los eucariotas y en regiones codificantes y no codificantes del ADN nuclear y de organelos (Pérez-Jiménez et al., 2013; Phumichai et al., 2015). Respecto al uso de SSR para *C. odorata*, Hernández y colaboradores (2008) desarrollaron un total de 26 marcadores microsatélites optimizados para PCR y seleccionados por ser altamente polimórficos, aunque solamente 9 de ellos fueron empleados en la estimación de la diversidad genética de poblaciones de semillas de la especie en Mesoamérica.

9 Estado del arte

9.1 Diversidad genética de *C. odorata*

Los estudios realizados en América se han basado en el uso de marcadores de tipo morfológicos y moleculares para comprender la variabilidad que presenta la especie en las diferentes poblaciones analizadas. En Costa Rica se realizó un estudio en ambientes húmedos y secos mediante una caracterización morfológica. Se tomaron datos de peso de semilla, altura, DAP y tamaño de folíolos. Se determinó que existen diferencias significativas en las características mencionadas llevando a una separación de las poblaciones dividiéndolas en las provenientes del pacífico norte y otras del pacífico sur (Navarro et al., 2002). Un estudio posterior a las mismas poblaciones, mediante AFLP,

determinó que las poblaciones de cada ecotipo se fijan para un solo haplotipo de cloroplasto con niveles de heterocigosidad total = 0.27 (Cavers et al., 2003a).

Con el uso del marcador AFLP se encontraron niveles medios de diversidad genética ($H_t = 0.22$) en las poblaciones de la Amazonía peruana. Los resultados sugieren que a pesar de los cambios suscitados por la deforestación del área y los altos niveles de perturbación circundante, el cedro ha sido capaz de mantener el flujo genético entre los individuos (de la Torre et al., 2008). El uso de los marcadores microsatélites desarrollados por Hernández y colaboradores (2008) mostraron un rango de 14 a 30 alelos por locus con niveles de heterocigosidad entre 0.61 y 0.88. Adicional a este estudio, el uso de ADN nuclear y de cloroplasto para un análisis a nivel mesoamericano fue desarrollado por Cavers, Navarro y Lowe (2004). Los resultados del estudio mostraron la presencia de varios haplotipos en toda la región, siendo el primero de ellos ubicado entre Yucatán, Honduras, Nicaragua y Noreste de Costa Rica; el segundo entre el resto de Costa Rica y Panamá. Con el análisis del ADN del cloroplasto se reconocieron cinco haplotipos dividiendo al cedro en tres grupos: a) Norte: dos haplotipos entre México y Guatemala, b) Central: un haplotipo entre Honduras, Nicaragua y Noreste de Costa Rica y c) dos haplotipos entre el resto de Costa Rica y Panamá.

Mediante el uso de ribosomas nucleares y plásmidos, otro estudio comprobó la existencia de cuatro nuevas especies las cuales se han identificado en las laderas de la Amazonía, la otra en el noreste de Perú, la tercera al norte de Perú y la cuarta en el Pacífico norte de El Salvador (Muellner et al., 2009). Un estudio más reciente en Nicaragua a través del marcador RAPD en cinco poblaciones obtuvo valores promedio de $H_o = 0.524$ y $H_e = 0.347$ y riqueza alélica de 2 para poblaciones con un nivel medio de diferenciación genética ($F_{st} = 0.13$) (A Tijerino et al., 2016).

Con el uso de microsatélites se realizó un análisis sobre ejemplares de cedro en Bolivia intentando hacer un estudio de trazabilidad forense, determinando que los materiales estudiados están compuestos de muchas líneas parentales, lo que complica la trazabilidad de los mismos (Paredes-Villanueva et al., 2019). Mediante el uso del mismo marcador molecular, el análisis de poblaciones de cedro en Tabasco, México, reporta la pérdida de diversidad en la especie ($F_{st} = 0.419$ y $H_o = 0.297$) debido a la constante erosión genética (Leshner-Gordillo, Martínez-Sánchez, Orduña-Rodas, & Hernández-Carreta, 2018).

9.2 Conservación del germoplasma bajo condiciones in vitro

En cuanto al establecimiento in vitro de *C. odorata* como método de conservación del germoplasma, existen varias experiencias como la inducción de embriogénesis somática mediante el uso del medio de cultivo MS suplementado con ácido absísico, llegando a obtener un 75% de establecimiento en condiciones ex vitro (Peña-Ramírez et al., 2011). Ensayos a través de rizogénesis en medio MS a partir de esquejes jóvenes también han sido desarrollados con resultados positivos (Millán-Orozco et al., 2011).

El uso de propagación masiva mediante biorreactores de inmersión temporal también han demostrado ser una opción viable para la restauración de plantaciones con materiales élite (Peña-Ramírez et al., 2010). El uso de la propagación in vitro, para el establecimiento de nuevas plantaciones a razón de la alta demanda del cedro, también se ha desarrollado a través de microesquejes y yemas apicales en medio de cultivo MS suplementado con fitohormonas como BAP y ANA llegando a concluir que las plantas regeneradas en condiciones in vitro no mostraron diferencias con aquellas desarrolladas a partir de semilla botánica (García-González et al., 2011)

10 Objetivo general

1. Identificar la diversidad genética del cedro (*Cedrela odorata* L.) en el área de la Sierra del Lacandón.

11 Objetivos específicos

1. Describir la estructura genética de las poblaciones de cedro en las áreas de estudio.
2. Determinar los niveles de riqueza y diversidad genética para las poblaciones identificadas en el área de estudio.
3. Conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro.

12 Hipótesis

Las poblaciones de cedro analizadas serán genéticamente diversas mostrando valores de heterocigosidad observada (H_o) superior a 0.40 y riqueza alélica (A_r) mayor a 17 con una alta diferenciación genética entre poblaciones (F_{st}) mayor a 0.30

13 Materiales y métodos

13.1 Enfoque y tipo de investigación

La presente investigación presenta un enfoque cuantitativo y con un alcance exploratorio, la cual tiene como finalidad la identificación de la diversidad genética de los materiales de cedro presentes en el país, lo cual constituye una primera etapa para un posterior proyecto de mejoramiento. Una vez realizado el análisis genético, la investigación también tendrá un alcance explicativo al describir la estructura genética poblacional y el estado general de la diversidad genética de la especie en las zonas de estudio.

13.2 Recolección de información

Basado en la información del primer informe nacional sobre el estado de los recursos genéticos forestales en Guatemala (INAB, IARNA-URL, 2012), el cual presenta registros de la especie en estudio, la colecta se realizó en la zona intangible del Parque Nacional Sierra de Lacandón. Las poblaciones se ubicaron específicamente en las cercanías del sitio arqueológico Piernas Negras (PN), municipio de la Libertad y en el municipio de las Cruces (LCN, LCC y LCS) del departamento de Petén (Figura 1). Para la primera fase, la cual consistió en el análisis de diversidad genética mediante el uso de microsatélites, se muestrearon 4 poblaciones tomando entre 10 y 15 individuos para un total de 54 muestras, con las cuales se realizó la caracterización molecular.

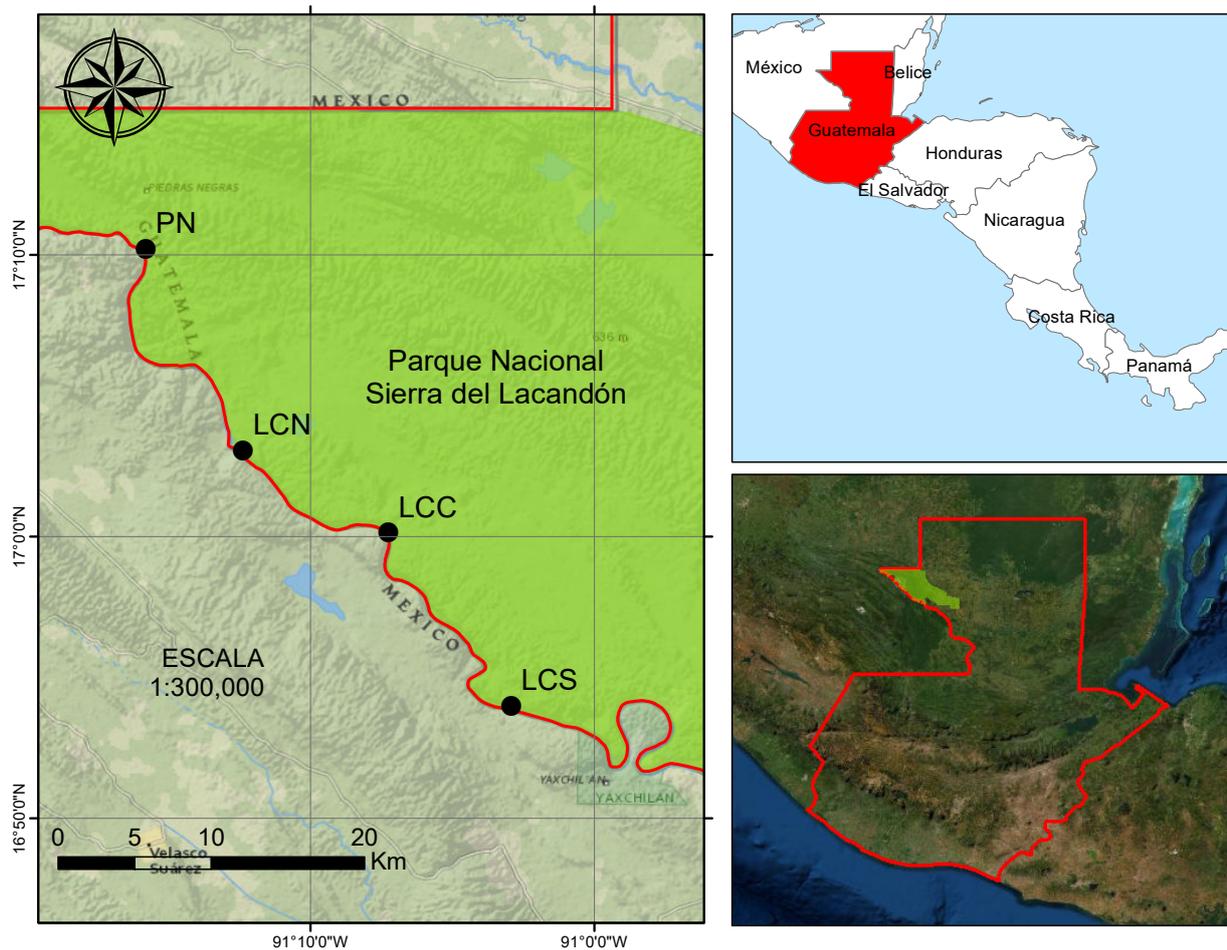


Figura 1. Ubicación de las poblaciones de *Cedrela odorata* analizadas en el estudio de estructura y diversidad genética. Identificación de las poblaciones analizadas: PN = Piedras Negras, LCN = Las Cruces Norte, LCC = Las Cruces Centro, LCS = Las Cruces Sur.

En cada punto de muestreo se tomaron las coordenadas con el uso de GPS. Se tomaron cinco hojas jóvenes de cada individuo, las cuales fueron colocadas en bolsas plásticas con sílica gel y debidamente identificadas por población y coordenadas geográficas. El proceso de colecta fue apoyado por personal de la Fundación Defensores de la Naturaleza. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía donde se realizó la extracción de ADN y estandarización de las condiciones de amplificación con los microsatélites.

El producto de PCR fue enviado al Laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Tropical AgriScience en Praga en donde se realizó el análisis de fragmentos amplificados para determinar el tamaño de cada alelo identificado. Para la segunda fase

se colectaron yemas axilares de los árboles identificados mediante el análisis molecular y estas fueron trasladadas al laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Agronomía para su establecimiento in vitro.

13.3 Técnicas e instrumentos

Extracción de ADN

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit comercial Gentra añadiendo algunas modificaciones para evitar la oxidación del material biológico. Se tomó una sección de cada hoja de aproximadamente 4 x 4 mm dentro de un tubo de 1.5 mL al cual se le agregaron 450 μ L de Cell Lysis Solution (+ 1 % PVP, + 0.3 % mercaptoetanol) y se procedió a macerar. Se agregaron 2.25 μ L de proteinasa K (100 μ g/mL) y se dejó incubar por 3 h a 65 °C realizando mezclas por inversión cada 30 min. Se agregaron 2.5 μ L de solución RNasa A (4 mg/mL) y se mezcló por inversión 25 veces dejando incubar nuevamente por 45 min a 37 °C. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 150 μ L de solución para precipitación de proteínas, se mezcló 150 veces por inversión, se colocó por 20 min a -20 °C, se centrifugó a 14,000 rpm durante 4 min y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo.

Se agregaron 600 μ L de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en una relación 25:24:1 se mezcló por inversión, se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 600 μ L de cloroformo (24): alcohol isoamílico (1) y se mezcló por inversión, se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. Se agregaron 600 μ L de isopropanol y se mezcló por inversión 50 veces, se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm, se descartó la fase líquida, se agregaron 500 μ L de etanol al 70 %, se mezcló por inversión para lavar la pastilla de ADN, se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm invirtiendo el tubo para descartar el etanol y dejando secar por 10 a 15 min sobre papel absorbente. Para la hidratación del ADN se agregaron 50 μ L de la solución para hidratación de ADN, se incubó a 65 °C por 1 h y finalmente se almacenó a -20 °C.

Amplificación por PCR

Los microsatélites a utilizados se detallan en la Tabla 1. Para la amplificación por PCR se tomó como base el protocolo de Hernández y colaboradores (2008) realizando reacciones individuales con cada microsatélite y corroborando su amplificación por

electroforesis en gel de agarosa para cerciorarse que la temperatura de alineamiento es correcta. Con las amplificaciones positivas, se procedió a preparar las reacciones de la siguiente manera: volumen total de 10 μ l, 5 μ l QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Germany), 3 μ l H₂O, 0,5 μ M Primer F, 0,5 μ M primer R y 20 ng de ADN.

Los grupos para el análisis multiplex fueron: multiplex 1 (ced2, ced22, ced65 y ced54); multiplex 2 (ced4, ced18, ced41) y PCR 3 (ced95). El perfil térmico para el PCR fue el siguiente: 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de 60 s a 95°C, 60 s a la temperatura indicada en la Tabla 1 para cada cebador, 60s a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente una temperatura de reposo de 4°C. Para verificar la amplificación de los microsatélites se tomaron muestras aleatorias para su visualización en gel de agarosa.

Tabla 1. *Detalle de los microsatélites utilizados para el análisis de diversidad genética de Cedrela odorata.*

Locus	Secuencia del primer 5'-3'	Tamaño (pb)	T (C)
Ced 2	F:TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R:AACTTTCGAA TTGGTTAAGG	130- 170	59
Ced 4	F:CTCTGTGTTAAACCCGAATC R:GAATAAATCGAAACGCACTC	200 - 220	57
Ced 18	F:CAAAGACCAAGATTTGATGC R:ACTA TGGGTGGCACAACACTAC	130 - 150	57
Ced 22	F:CTTCGCCTTGGCCTTTCTAC R:CGGAGGAGATCGCAGTTTAT	120 - 140	59
Ced 41	F:TCATTCTTGGATCCTGCTAT R:GTGGGAAAGATTGTGAAGAA	120 - 160	57
Ced 54	F:GATCTCACCCACTTGAAAAA R:GCTCATATTTGAGAGGCATT	180 - 230	59
Ced 65	F:GAGTGAGAAGAAGAA R:TCGTGATAGC	160 - 200	59
Ced 95	F:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC R:TTA TCATCTCCCTCACTCCA	190 - 250	53

Análisis de fragmentos amplificados

Los resultados del PCR se analizaron por medio de electroforesis capilar con un secuenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU). Para el análisis se mezcló 1 μ l de producto PCR con 0,2 μ l de GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems,

EEUU) y 12 μ l de Hi- Di formamida (Applied Biosystems, EEUU). El tamaño de los alelos se determinó con el programa GeneMarker versión 2.4.0.

Establecimiento de colección núcleo bajo condiciones in vitro

Tras obtener los resultados del análisis de diversidad genética con los microsatélites, se seleccionaron un máximo de 25 árboles genéticamente diversos. La selección se realizó en base al dendrograma de individuos generado a partir de la electroforesis capilar. De las yemas axilares que se colectaron de estos individuos, se realizó el establecimiento in vitro. Para el proceso de desinfección de los explantes se siguió el protocolo descrito por Teixeira, Winarto, Dobránszki y Zeng (2015). Luego del proceso de desinfección, para asegurar el montaje del ensayo de multiplicación con yemas no contaminadas, estas fueron establecidas en un medio basal MS por un período de 2 semanas.

Seguido, se tomó como base el protocolo descrito por García-González y colaboradores(2011) quienes sugieren un medio basal MS suplementado con 2 mg L⁻¹ BAP and 3 mg L⁻¹ANA. También se evaluó el medio basal WPM. Adicionalmente, se evaluaron 3 concentraciones de BAP (0.5, 1.5 y 2.5 mg L⁻¹) y 8 concentraciones de auxinas: IBA (0, 0.05, 0.25, 1.0 mg L⁻¹) y ANA (0, 1.5, 2.5 y 3.5 mg L⁻¹). El experimento consistió de dos factores (a) niveles de concentraciones de BAP y (b) niveles de concentración de auxinas. El experimento tuvo un diseño completamente al azar (DCA) con 5 repeticiones y cada unidad experimental estuvo compuesta de un tubo de ensayo que con una yema axilar. La variable de respuesta fue el número de brotes por yema a las 9 semanas de establecido el ensayo.

Una vez identificado el medio óptimo para la multiplicación, las yemas fueron transferidas a un medio basal sin suplementación de hormonas durante 2 semanas. Posteriormente, las yemas fueron transferidas a los medios de prueba para conservación, los cuales consistieron de un medio basal MS con cuatro niveles de concentración de sorbitol. Las dosis evaluadas fueron 1, 2, 3 y 4 % de sorbitol y la variable de respuesta fue el porcentaje de sobrevivencia y longitud de los explantes a las 10, 15 y 20 semanas. Se empleó un diseño completamente al azar (DCA). Al identificar el medio óptimo, los materiales de cedro fueron transferidos para su conservación a largo plazo.

13.4 Procesamiento y análisis de la información

La diversidad genética por locus y población se evaluó mediante el uso de GenAIEx 6.5.1 (Peakall & Smouse, 2012). Se calculó el número de alelos diferentes (N_a), el número de alelos efectivos (N_e), las heterocigosidades observadas (H_o) y esperadas (H_e), y el índice de diversidad de Shannon (I). Además, se calculó la riqueza alélica (A_r), el coeficiente de diferenciación entre pares de poblaciones (F_{ST}), y el coeficiente de consanguinidad (F_{IS}) (Weir & Cockerham, 1984) en FSTAT 2.9.3 (Goudet, 1995). El Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) y la matriz pareada de los valores F_{st} de las poblaciones, se calcularon utilizando el programa GenAIEx 6.5 (Peakall & Smouse, 2006, 2012). El flujo genético (N_m) entre poblaciones se estimó usando la ecuación $N_m = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$.

El análisis de las componentes principales (PCA) de todos los genotipos de *C. odorata* se llevó a cabo utilizando el paquete ade4 (Bougeard & Dray, 2018). La matriz pareada de valores F_{st} generada en GenAIEx se exportó al programa Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis PAST v3.18 (Ryan et al., 2001) y se analizó con el algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987) generando un dendrograma en formato Nexus, el cual fue exportado hacia el programa FigTree v1.4.3 (Rambaut, 2008) para una mejor visualización del dendrograma a nivel de las poblaciones de *C. odorata*.

Para inferir la estructuración genética de las poblaciones muestreadas, se utilizó un método de agrupación basado en un modelo bayesiano, implementado por el programa STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). El programa se ejecutó con 10,000 repeticiones, seguidos de 100,000 iteraciones MCMC para el número de agrupaciones $K=1$ a 10, con diez repeticiones para cada K . El modelo asumió una frecuencia alélica correlacionada para las poblaciones y una ascendencia mixta (mezcla) para los individuos. Debido a que se asumió una estructuración débil, se implementó el modelo *Locprior*, que utiliza los lugares de muestreo como información previa para ayudar a la agrupación (Hubisz et al., 2009). Debido a la desigualdad del muestreo en las poblaciones geográficas, los parámetros alfa se fijaron en $1/K$, siguiendo las recomendaciones (Wang, 2017).

Los archivos de salida fueron analizados con STRUCTURE HARVESTER, un programa para compilar los resultados generados por el programa STRUCTURE (Earl & vonHoldt, 2012), que aplica el método de Evanno (Evanno et al., 2005), para detectar el número óptimo de K que mejor se ajusta a los datos. Las Q-matrices replicadas resultantes

para el K óptimo fueron alineadas en el programa CLUMPP (Jakobsson & Rosenberg, 2007) y se visualizó un gráfico de barras usando el programa Distruct (Rosenberg, 2004).

Para confirmar el patrón de estructuración poblacional, se realizó un análisis discriminante de componentes principales (DAPC) con el paquete adegenet (Jombart, 2008) analizando un número máximo de 25 clusters, reteniendo 50 componentes principales. La asignación de probabilidad de pertenencia de cada individuo también se realizó con el paquete adegenet. La prueba de correlación de mantel para la identificación de un posible aislamiento por distancia se realizó con el paquete ade4 siguiendo el método de Monte-Carlo con 999 permutaciones.

Con los datos obtenidos del establecimiento in vitro, se procedió a realizar una prueba de asociación con Chi cuadrado para las variables de sobrevivencia, mientras que para las variables de número de brotes y longitud de plantas se realizó un análisis de varianza. Ambas pruebas se realizaron con un nivel de significancia del 5 %, con base en el diseño experimental propuesto en la metodología (DCA), empleando el software estadístico R v3.6.3 con el paquete stats (R coreTeam, 2020) y agricolae (de Mendiburu, 2020). La visualización de los resultados de las pruebas de asociación de Chi cuadrado, análisis de varianza y comparaciones pareadas, se realizaron con el paquete ggstatsplot (Patil, 2018). Para poder aplicar el análisis de varianza se evaluaron los supuestos de normalidad utilizando la prueba de Shapiro y Bartlett, respectivamente.

14 Vinculación, difusión y divulgación

Se contó con la vinculación de la Czech University of Life Sciences, la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC y con la Fundación Defensores de la Naturaleza.

15 Productos, hallazgos, conocimientos o resultados

15.1 Describir los niveles de riqueza y diversidad genética de las poblaciones de cedro.

Un total de 70 alelos fueron amplificados con los ocho microsatélites a través de las 54 muestras de *C. odorata* con una valor máximo, mínimo y promedio por locus de 9.5, 2.75 y 6.38, respectivamente. La distribución de genotipos por población se muestra en la Figura 2.

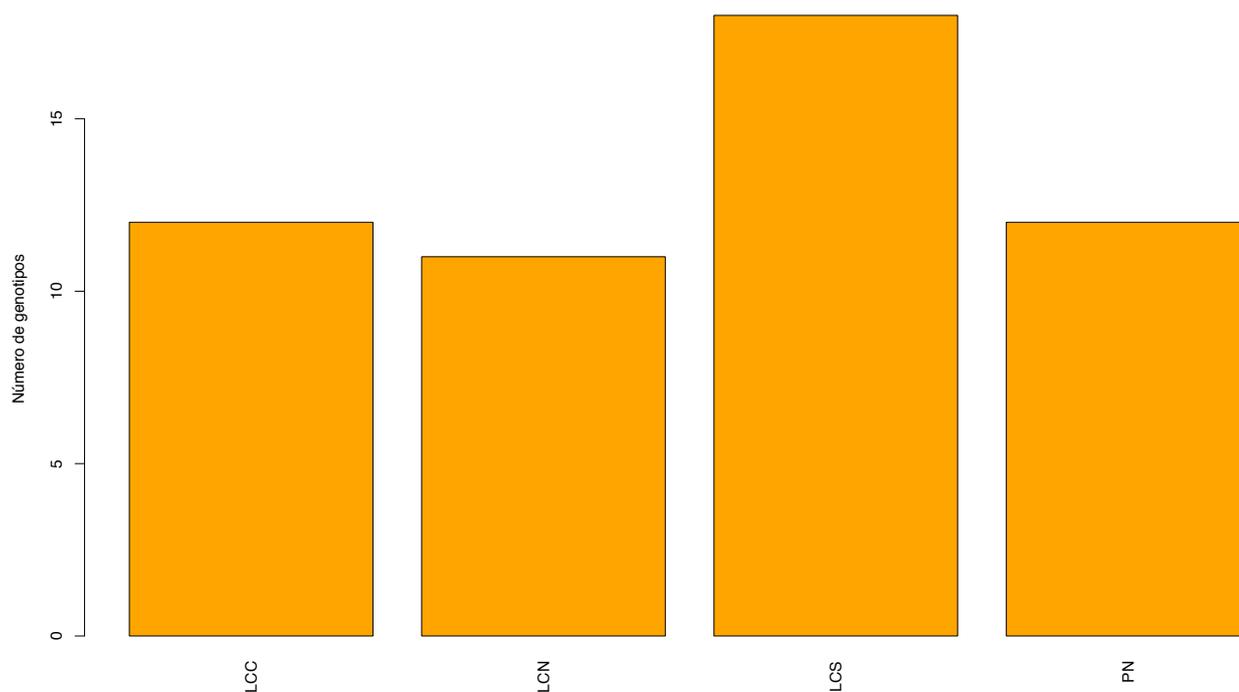


Figura 2. Número de genotipos analizados en cada población de *Cedrela odorata*.

Entre los loci, la heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e) estuvo en el rango de 0.194 a 0.917 y de 0.288 a 0.866 con un valor promedio de 0.629 y 0.701, respectivamente. La distribución de alelos por locus analizados se muestra en la Figura 3. La heterocigosidad observada fue mayor que la esperada en los loci Ced41 y Ced95 (Figura 4).

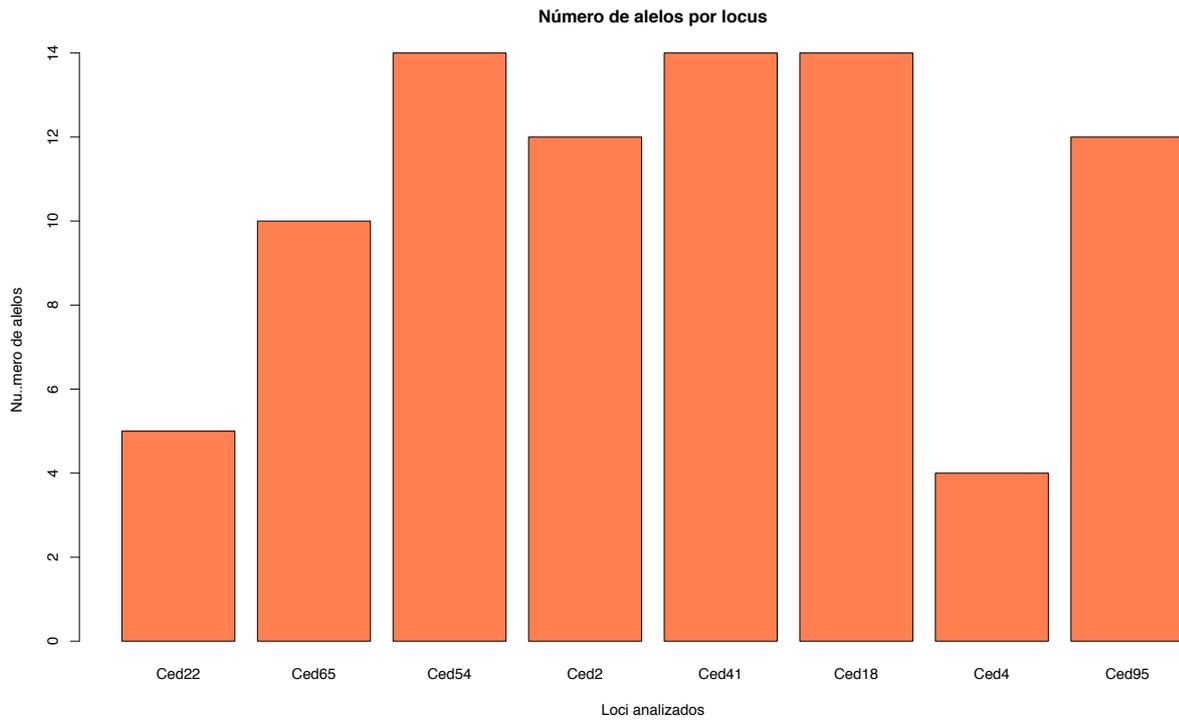


Figura 3. Número de alelos identificados por locus analizado en las poblaciones de *Cedrela odorata*.

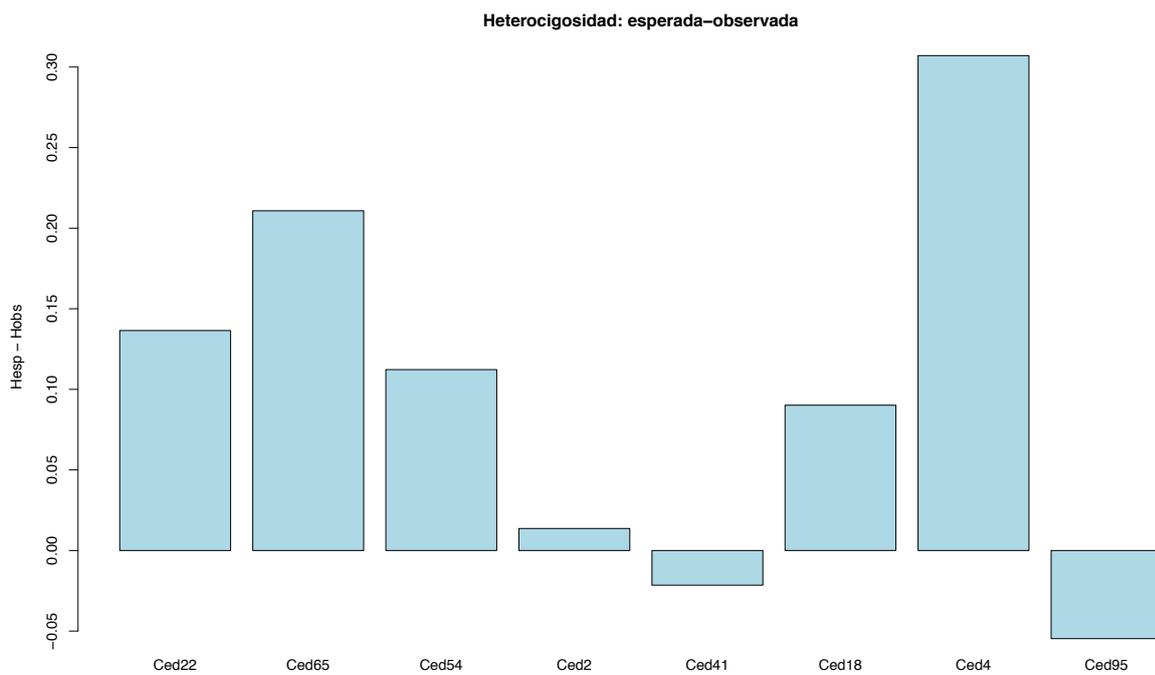


Figura 4. Comparación de los valores de la heterocigosidad esperada menos la heterocigosidad observada para cada locus analizado.

La riqueza alélica estuvo en el rango de 2.8 a 9.4 con un valor promedio de 6.5. Mientras tanto, el valor de consanguinidad Fis mostró un valor positivo para seis de los ocho loci, indicando la presencia de endogamia. El valor promedio de Fis fue de 0.182 indicando un déficit de individuos heterocigotos en las poblaciones de *C. odorata*. El detalle de todos los parámetros puede observarse en la Tabla 2.

Tabla 2. *Parámetros de diversidad genética del número de alelos (Na), número de alelos efectivos (Ne), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), riqueza alélica (Ar) y el coeficiente de consanguinidad (Fis) para cada locus.*

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	Ar	Fis
Ced22	12.75	2.75	1.492	0.501	0.194	0.288	2.8	0.303
Ced65	12.50	4.75	2.869	1.192	0.482	0.668	4.9	0.246
Ced54	12.25	9.00	5.612	1.905	0.740	0.847	8.9	0.088
Ced2	12.00	8.25	5.765	1.876	0.814	0.848	8.3	-0.002
Ced41	12.75	8.50	6.016	1.922	0.900	0.861	8.7	-0.089
Ced18	12.75	9.50	5.810	1.936	0.751	0.837	9.4	0.065
Ced4	12.00	3.50	2.265	0.930	0.238	0.549	3.9	0.546
Ced95	4.00	4.75	3.930	1.363	0.917	0.866	4.9	0.295
Promedio	11.38	6.38	4.22	1.45	0.629	0.701	6.5	0.182

Los índices de diversidad genética a nivel de poblaciones se muestran en la Tabla 3. Entre poblaciones, Na y Ne estuvieron entre 5.3 a 8.3 y 3.8 a 4.9, con promedios de 6.3 y 4.2, respectivamente. Ho estuvo en el rango de 0.584 a 0.727, He estuvo en el rango de 0.687 a 0.764, con valores promedios de 0.692 y 0.721, respectivamente. Ho fue menor a He para todas las poblaciones. El valor promedio de Ar fue de 6.65, siendo la población D la que mostró el valor más alto (8.2) y la población A el valor más bajo (5.4). El valor de Fis fue positivo y estadísticamente significativo para todas las poblaciones, indicando una desviación en el equilibrio de Hardy-Weinberg con un déficit de heterocigotos. El número de migrantes Nm por cada generación fue de 11.

De esta forma, basado en el valor de He como indicador de la diversidad genética general de las poblaciones de *C. odorata*, esta es relativamente alta, siendo las

poblaciones LCC y LCS las poblaciones con mayor diversidad, mientras que la población PN es la población con menor nivel de diversidad genética.

Tabla 3. *Parámetros de diversidad genética del número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), índice de Shannon (I), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada no sesgada (uHe), riqueza alélica (Ar) y el coeficiente de consanguinidad (Fis) para cada población. Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$) y ** ($p < .001$).*

Población	N	N_a	N_e	I	H_o	uHe	Ar	Fis
PN	10.125	5.3	3.8	1.316	0.584	0.687	5.4	0.156*
LCN	9.125	5.5	3.3	1.285	0.641	0.679	6.3	0.046*
LCC	10.250	6.2	4.8	1.512	0.566	0.752	6.7	0.258**
LCS	16.000	8.3	4.9	1.699	0.727	0.764	8.2	0.049*
Promedio	11.375	6.3	4.2	1.453	0.629	0.721	6.65	0.127*

15.2 Describir la estructura genética de las poblaciones de cedro.

Al estimar el grado de diferenciación global entre las cuatro poblaciones de *C. odorata*, el valor de F_{st} fue de 0.022. Los valores por pares de F_{st} por pares fueron bajos (0.023 – 0.053) y solamente el valor de F_{st} entre la población PN y LCS no mostró diferencia estadísticamente significativa ($p < .05$) (Tabla 4).

Tabla 4. *Matriz de comparación por pares del valor de F_{st} para todas las poblaciones de *Cedrela odorata*. Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$)*

Población	A	B	C	D
PN	0			
LCN	0.041*	0		
LCC	0.044*	0.053*	0	
LCS	0.031	0.042*	0.023*	0

El dendrograma generado a partir de valores de F_{st} , muestra el bajo nivel de diferenciación entre las poblaciones, observándose la formación de dos grupos, representados por las poblaciones LCS, LCC y PN, LCN; respectivamente (Figura 5).

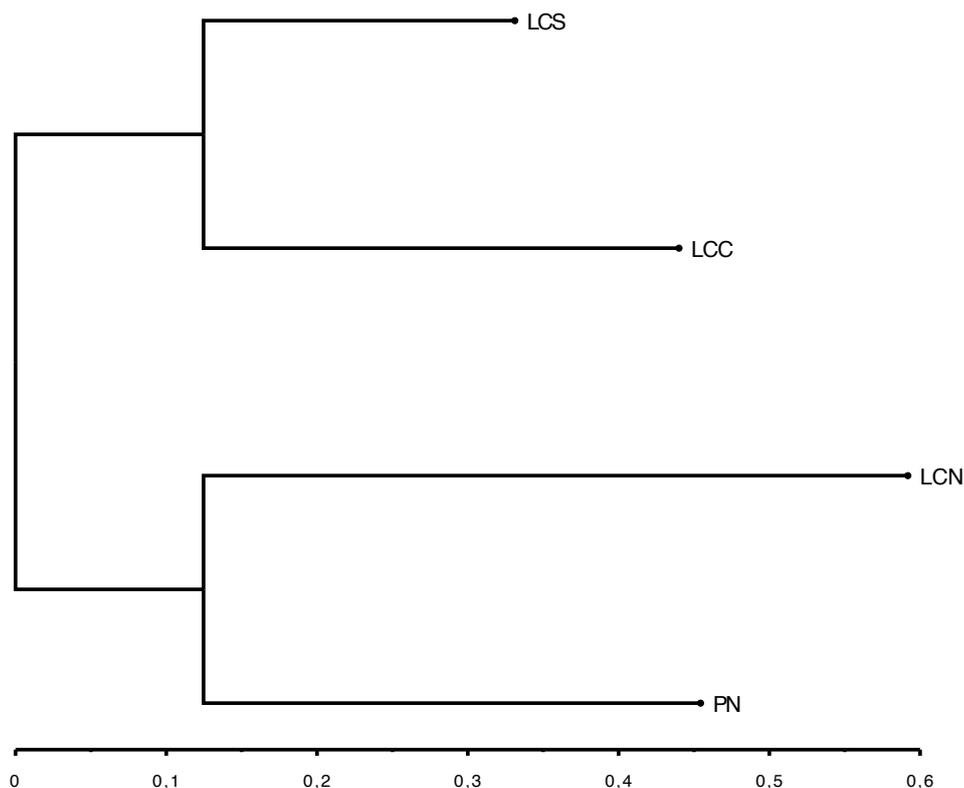


Figura 5. Dendrograma de tipo Neighbour-joining mostrando la relación genética entre las cuatro poblaciones de *Cedrela odorata* basado en la matriz pareada de los valores de F_{st} .

En cuanto al análisis molecular de varianza entre las poblaciones (Tabla 5), este mostró que la variación genética entre las poblaciones fue únicamente del 3%. La mayor variación genética se presentó dentro de las poblaciones con un valor de 97% de la variación, existiendo un muy bajo nivel de diferenciación genética entre las poblaciones analizadas.

Tabla 5. *Análisis molecular de varianza de las poblaciones de Cedrela odorata*. .
Valores estadísticamente significativos están indicados con * ($p < .05$), ** ($p < .01$)

Fuente de variación	df	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	Porcentaje de variación	Estadístico F_{st}
Entre poblaciones	3	32.481	0.261	3%	0.022**
Dentro de las poblaciones	50	368.593	7.372	97%	
Total	53	401.074	7.633	100%	

El alto grado de variación genética dentro de las poblaciones, así como el bajo nivel de diferenciación entre poblaciones puede observarse mediante el dendrograma a nivel de individuos (Figura 6) y análisis de componentes principales (Figura 7).

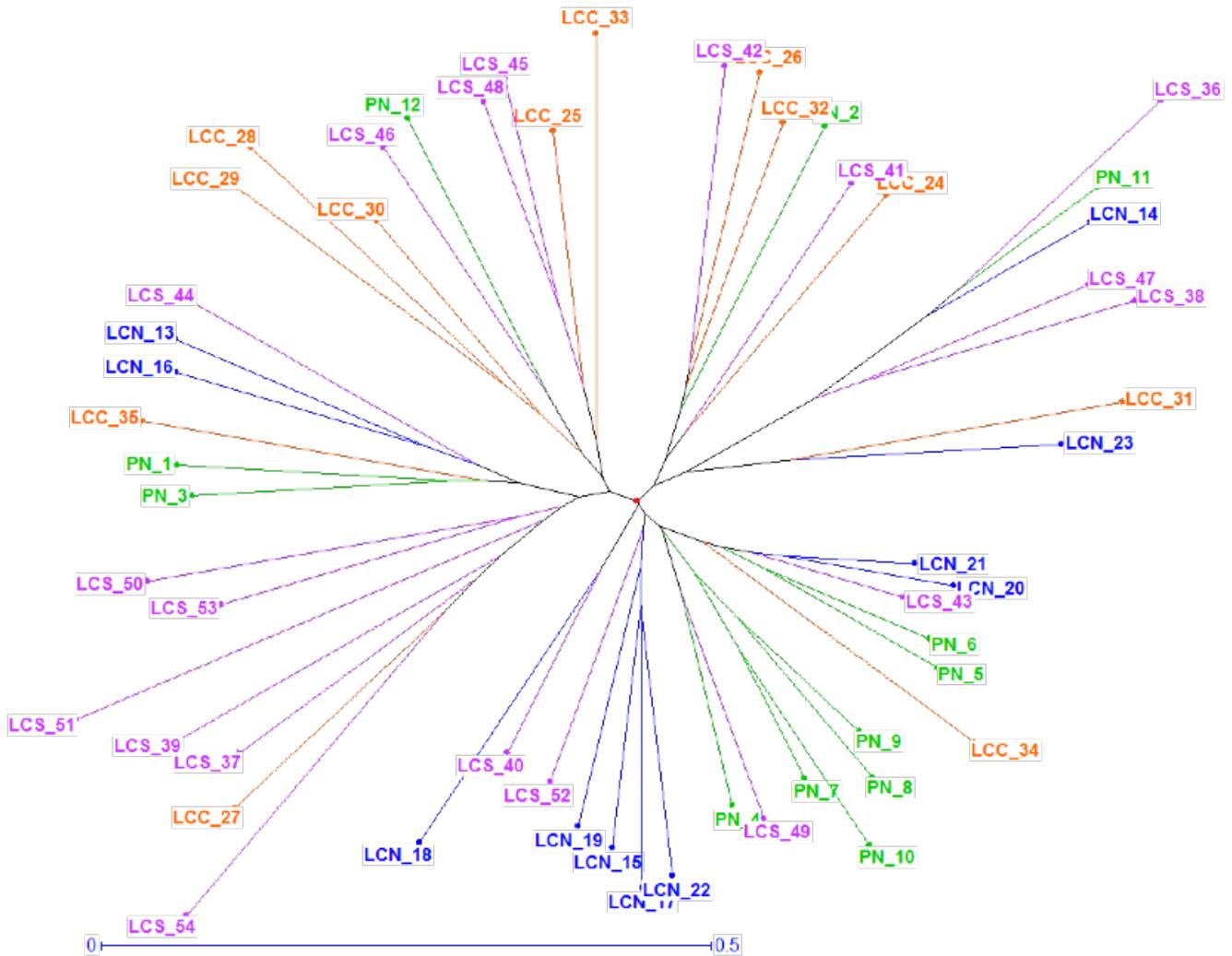


Figura 6. Dendrograma de tipo Neighbor-Joining (NJ) con arreglo radial generado a partir de 8 marcadores microsatélites que muestra la diversidad genética de los 54 genotipos de *Cedrela odorata* analizados.

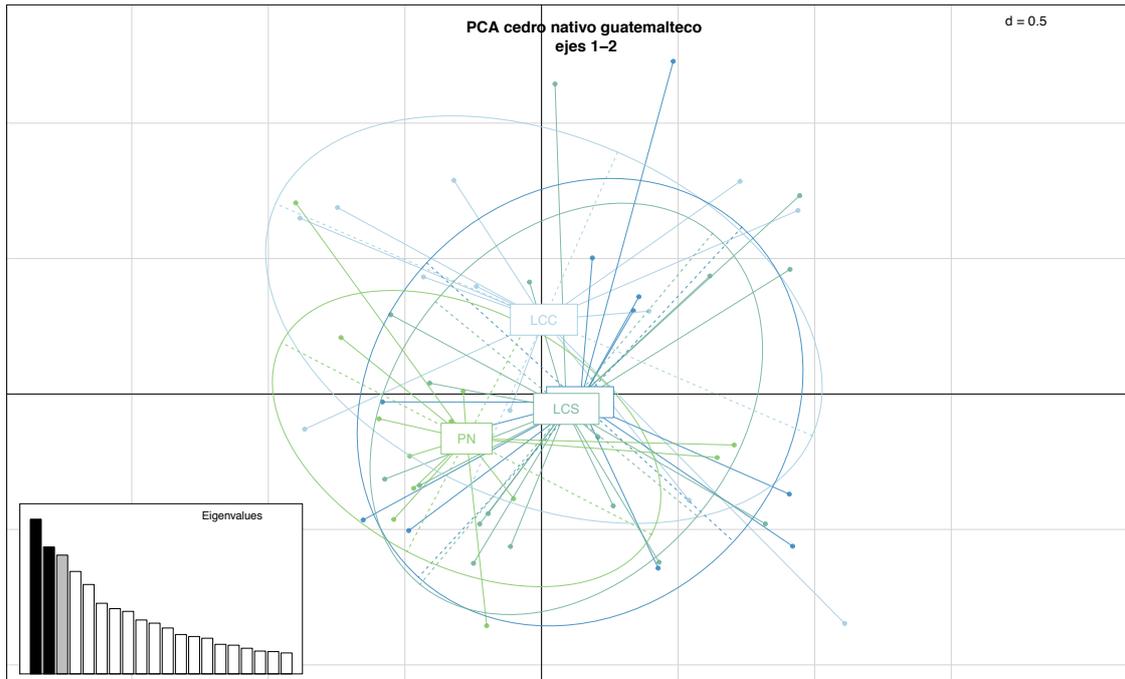


Figura 7. Análisis de coordenadas principales que revela el patrón de agrupación de los 54 individuos de *Cedrela odorata*. Los puntos representan los individuos de cada población indicada por cada color.

El análisis de estructura poblacional proporcionó información adicional sobre el nivel de la mezcla genómica entre las poblaciones. Los resultados obtenidos por STRUCTURE mostraron que con $K = 4$ y $K = 2$ el ΔK reveló los valores óptimos (Figura 8).

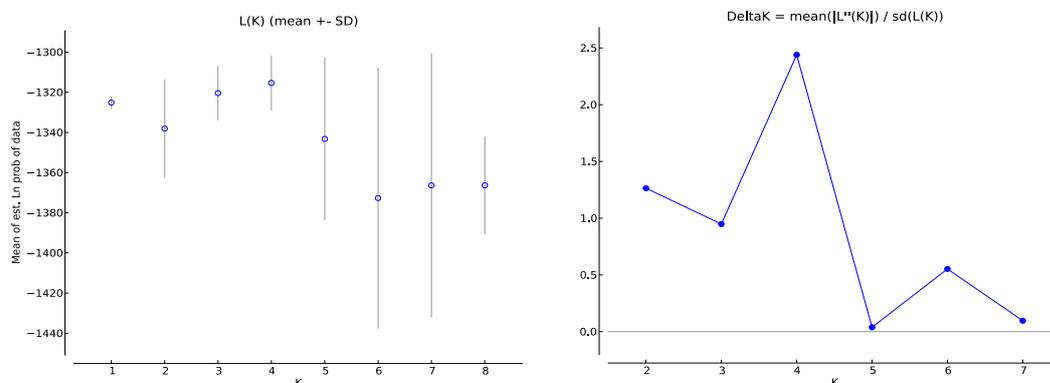
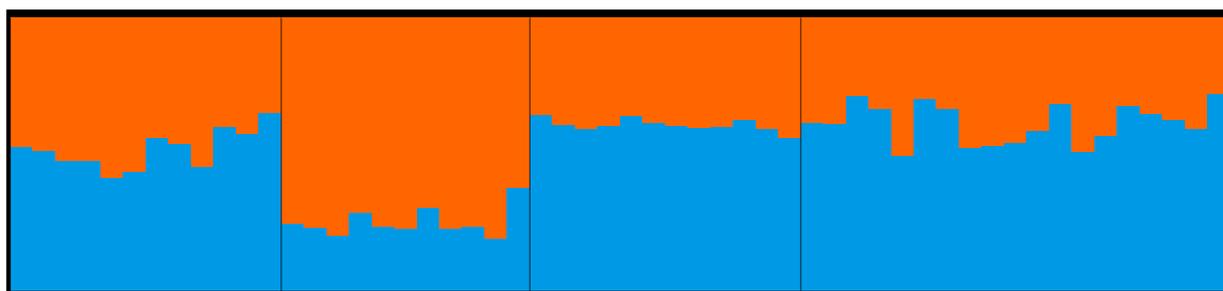


Figura 8. Valores de diagnóstico de L (K) y Delta-K del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de *Cedrela odorata*.

Esto indica que la división más probable de las poblaciones de *C. odorata* incluía cuatro o dos grupos genéticos (Figura 9). Cuando $K = 2$ la población LCN fue predominantemente asignada al grupo genético representado por el color naranja, mientras el resto de poblaciones fue distribuido en proporciones casi igualitaria entre los dos grupos genéticos. Cuando $K = 4$ las poblaciones LCC y LCS fueron predominantemente asignadas al grupo genético representado por el color celeste, mientras las poblaciones PN y LCN fueron asignadas en mayor proporción al grupo genético de color naranja.

$K = 2$



$K = 4$

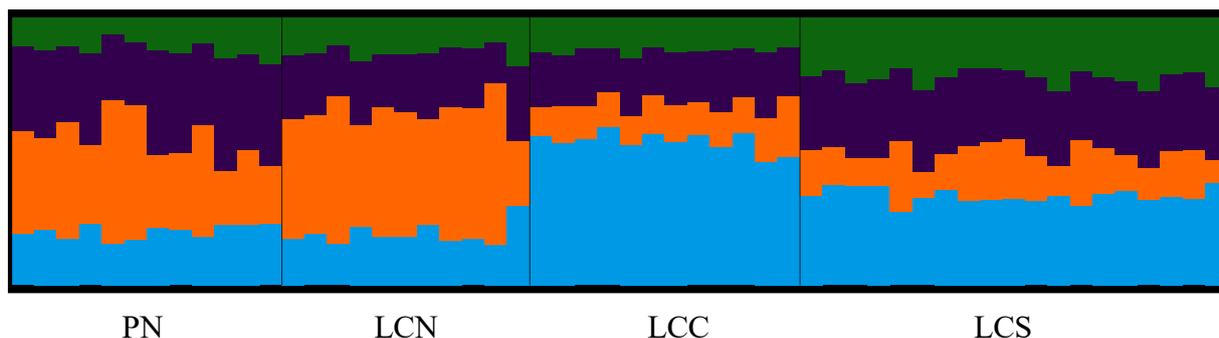


Figura 9. Resultados del análisis de STRUCTURE de las poblaciones de *Cedrela odorata* para $K = 2$ y $K = 4$. Cada individuo está representado por una única barra vertical, que está dividida en grupos genéticos. Los colores representan grupos genéticos, y los segmentos coloreados muestran la proporción de ancestros estimada del individuo.

Al realizar el análisis discriminante de componentes principales (DAPC), se identificó que los individuos fueron mayormente asignados en cuatro grupos como se observa en la Figura 10.

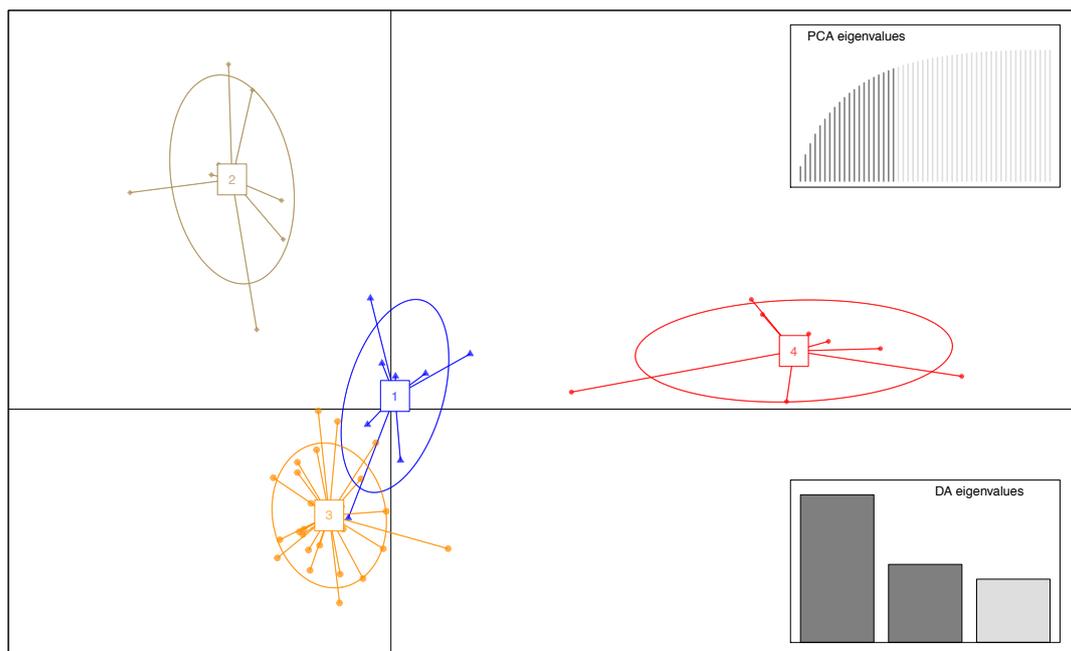


Figura 10. Análisis discriminante de componentes principales de los 54 genotipos de *Cedrela odorata* para la identificación de estructura poblacional.

Una vez realizado el DAPC se procedió a realizar la asignación de cada individuo a los grupos individuales basados en la inferencia de su procedencia genética más probable como se muestra en la Figura 11.

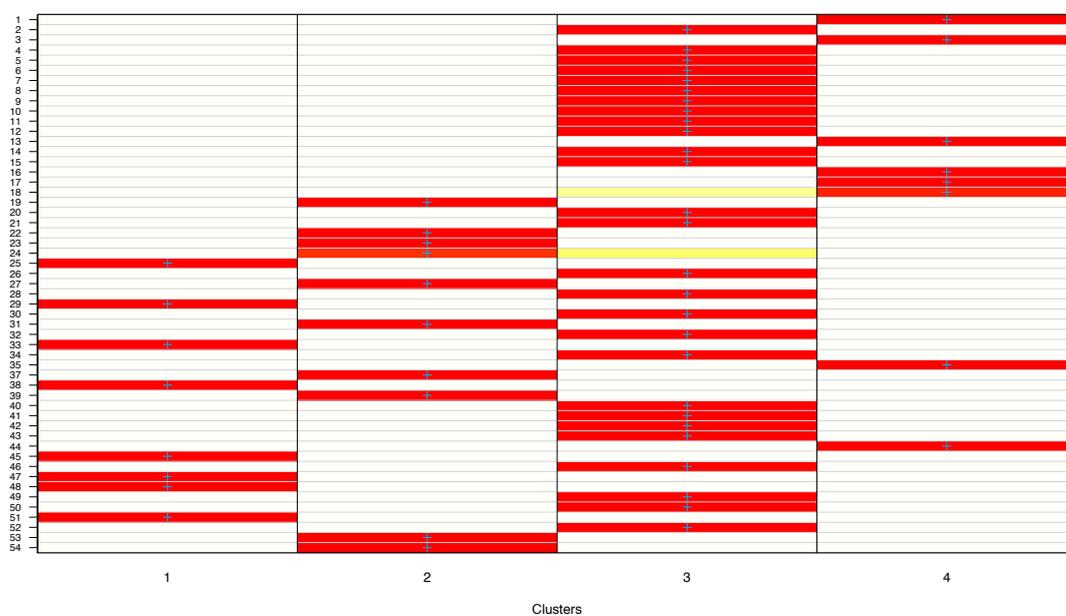


Figura 11. Asignación de los genotipos de *Cedrela odorata* a cada uno de los grupos genéticos inferidos en base al análisis discriminante de componentes principales.

El análisis de aislamiento por distancia mediante la prueba de correlación de mantel entre las distancias geográficas y genéticas mostraron un valor $p = 0.201$ luego de 999 permutaciones (Figura 12).

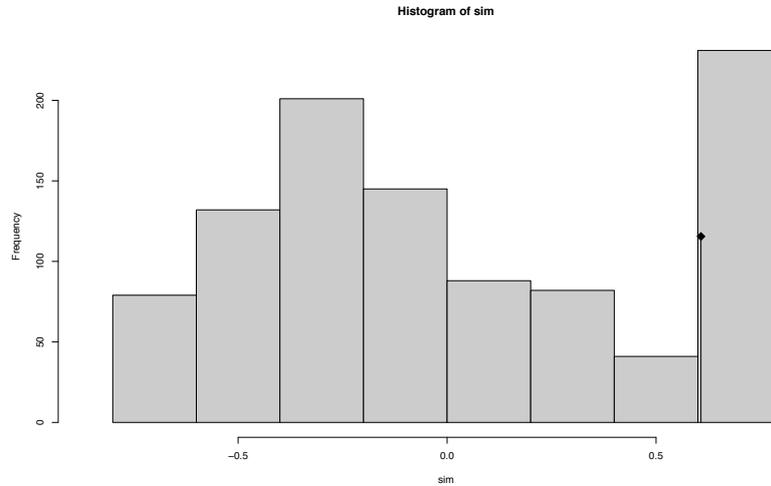


Figura 12. Resultados de la prueba de mantel de correlación espacial luego de 999 permutaciones mediante el método de Monte-Carlo.

Por tal razón, se descartó la posibilidad de que existiera un aislamiento por distancia como se visualiza en la Figura 13, en la cual no se puede establecer un patrón de correlación entre la distancia geográfica y genética.

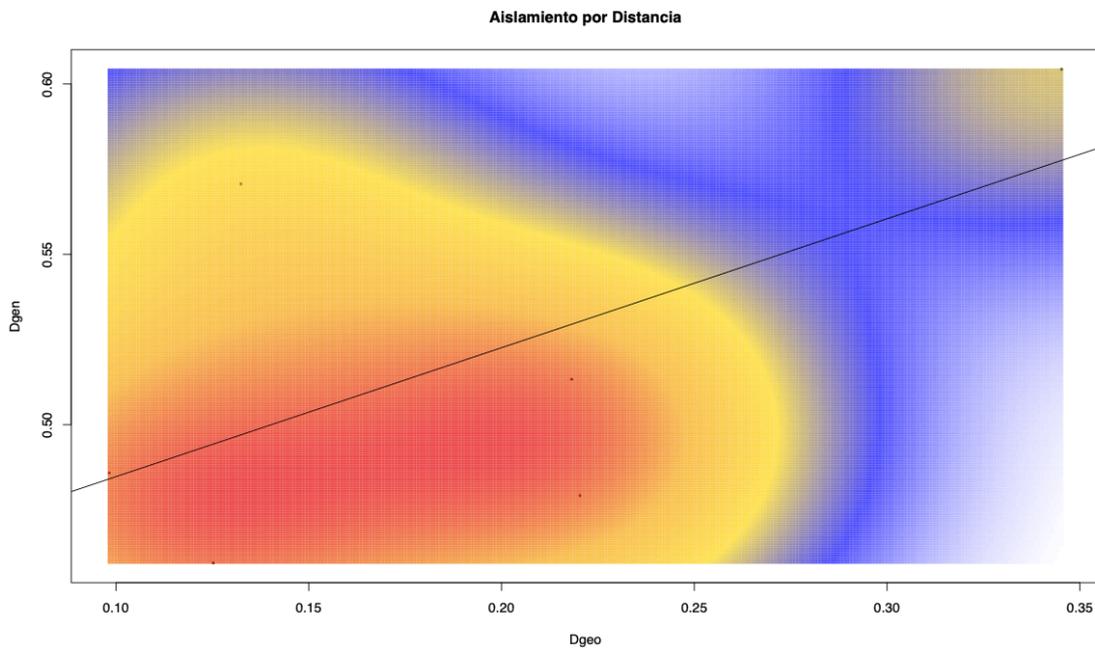


Figura 13. Método de aislamiento por distancia entre las distancias geográfica y genética de las poblaciones analizadas.

15.3 Conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro

Los ensayos para la inducción de brotes a partir de explantes de *C. odorata* mostraron que el medio MS suplementado con 2 y 3 mg L⁻¹ de BAP y ANA, respectivamente; el medio WPM suplementado con 2.5 y 3.5 mg L⁻¹ de BAP y ANA, respectivamente y el medio WPM suplementado con 2.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP e IBA, respectivamente mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$).

El tamaño del efecto entre los tratamientos de eta cuadro η^2p fue alto ($\eta^2p = 0.91$), remarcando la diferencia entre los tratamientos. Tanto el medio MS suplementado con 2 y 3 mg L⁻¹ de BAP y ANA como el WPM con 2.5 mg/l y 3.5 mg/l de BAP y ANA resultaron ser más efectivos en comparación a la suplementación de 2.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP e IBA en el medio WPM. El detalle de la evaluación se puede observar en la Figura 14.

$$F_{\text{Welch}}(2,7.95) = 61.59, p = 1.46e-05, \hat{\eta}_p^2 = 0.91, CI_{95\%} [0.76, 0.95], n_{\text{obs}} = 15$$

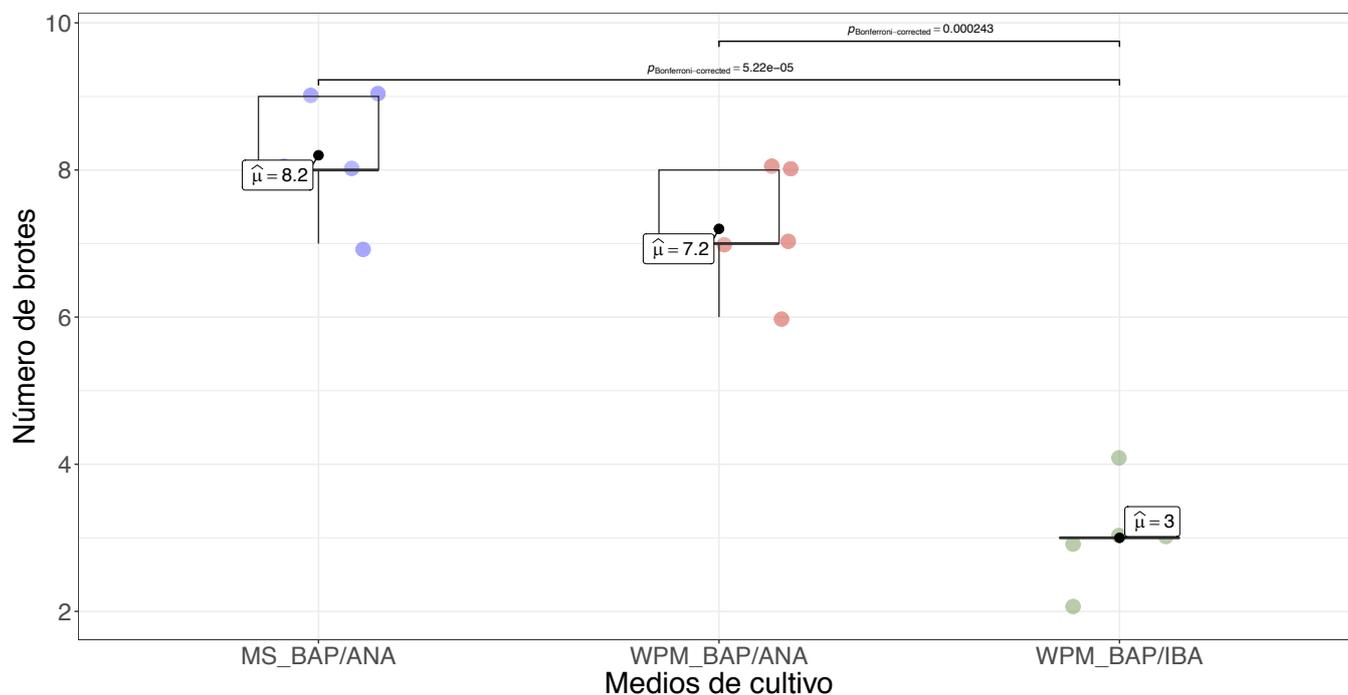


Figura 14. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *Cedrela odorata* establecidos sobre medio MS y WPM. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

La comparación de las diferentes dosis de BAP en combinación con ANA sobre el medio WPM fue estadísticamente significativa ($p < 0.001$). El tamaño del efecto entre los tratamientos de esta cuadro η^2p fue alto ($\eta^2p = 0.90$), remarcando a diferencia entre los tratamientos. La comparación pareada de medias mostró que los tratamientos suplementados con 2.5 mg L^{-1} de BAP en combinación con 2.5 , y 3.5 mg L^{-1} de ANA. El detalle de los resultados del ensayo se muestra en la Figura 15.

$$F_{\text{Welch}}(11, 18.89) = 27.44, p = 2.73e-09, \hat{\eta}_p^2 = 0.90, CI_{95\%} [0.84, 0.93], n_{\text{obs}} = 60$$

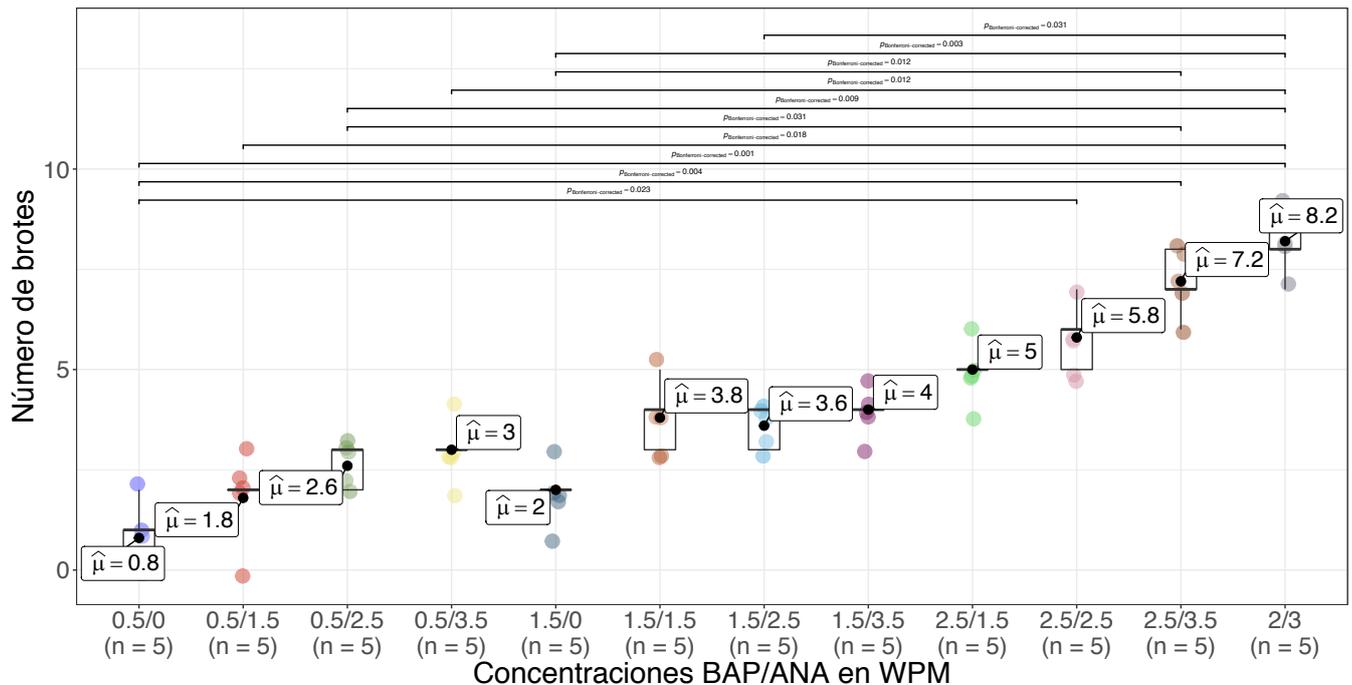


Figura 15. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio WPM con diversas concentraciones de BAP y ANA y en el medio MS con la combinación de 2/3 BAP/ANA respectivamente. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

La comparación de las diferentes dosis de BAP en combinación con IBA sobre el medio WPM, también fue estadísticamente significativa ($p = 0.003$). El tamaño del efecto entre los tratamientos de esta cuadro η^2p fue alto ($\eta^2p = 0.56$), remarcando la diferencia entre los tratamientos. La comparación pareada de medias mostró que los tratamientos

suplementados con 2.5 mg L⁻¹ de BAP en combinación con 0, 0.05, 0.25 y 1.0 mg L⁻¹ de IBA. El detalle de los resultados del ensayo se muestra en la Figura 16.

$$F_{\text{Welch}}(11, 18.89) = 4.17, p = 0.003, \hat{\eta}_p^2 = 0.56, \text{CI}_{95\%} [0.28, 0.66], n_{\text{obs}} = 60$$

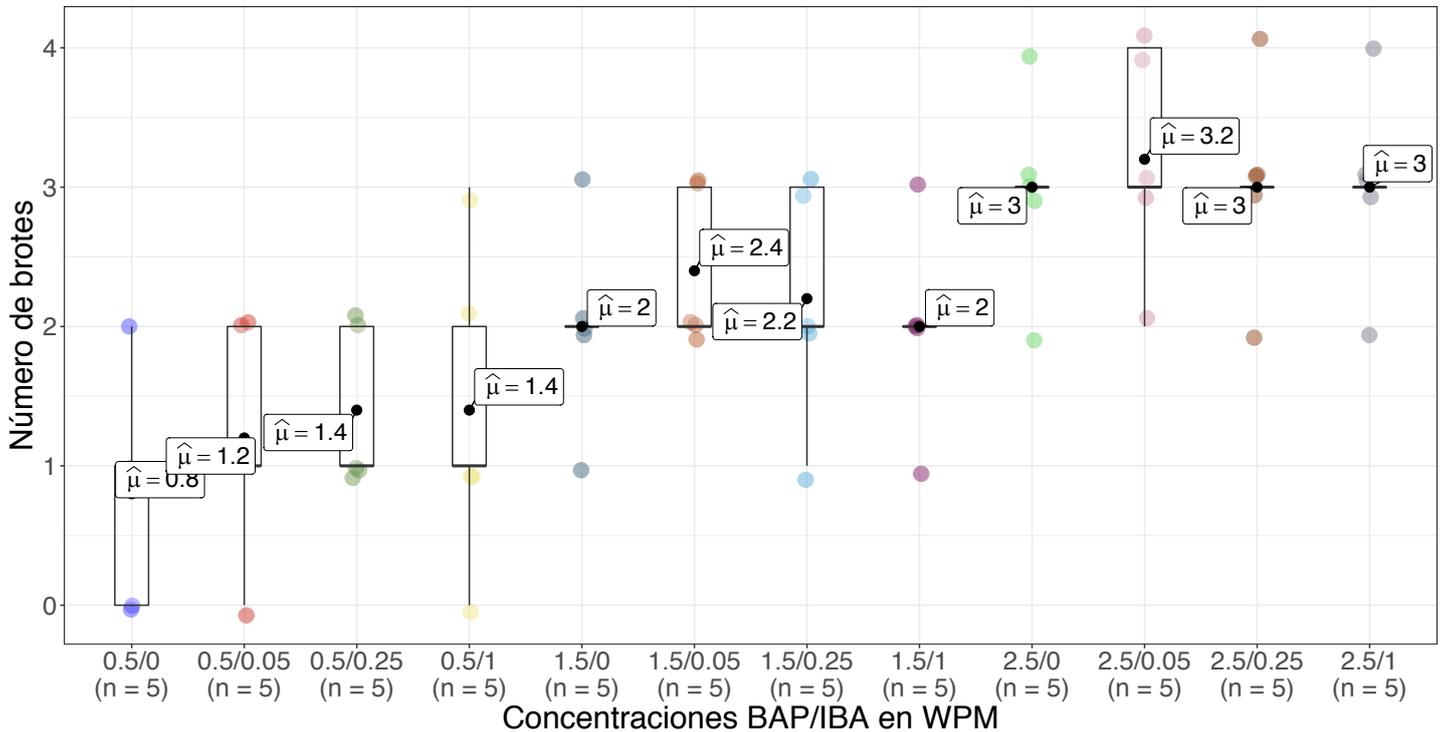


Figura 16. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio WPM con diversas concentraciones de BAP e IBA. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

En cuanto a la comparación de la combinación de tipos de hormonas, los tratamientos mostraron diferencia significativa ($p < 0.001$), con un tamaño del efecto alto ($d_{\text{cohen}} = 1.05$) evidenciando que la combinación BAP/ANA, en términos generales agrupando todas las combinaciones, presenta mejores resultados en comparación a la combinación BAP/IBA para el desarrollo de brotes (Figura 17).

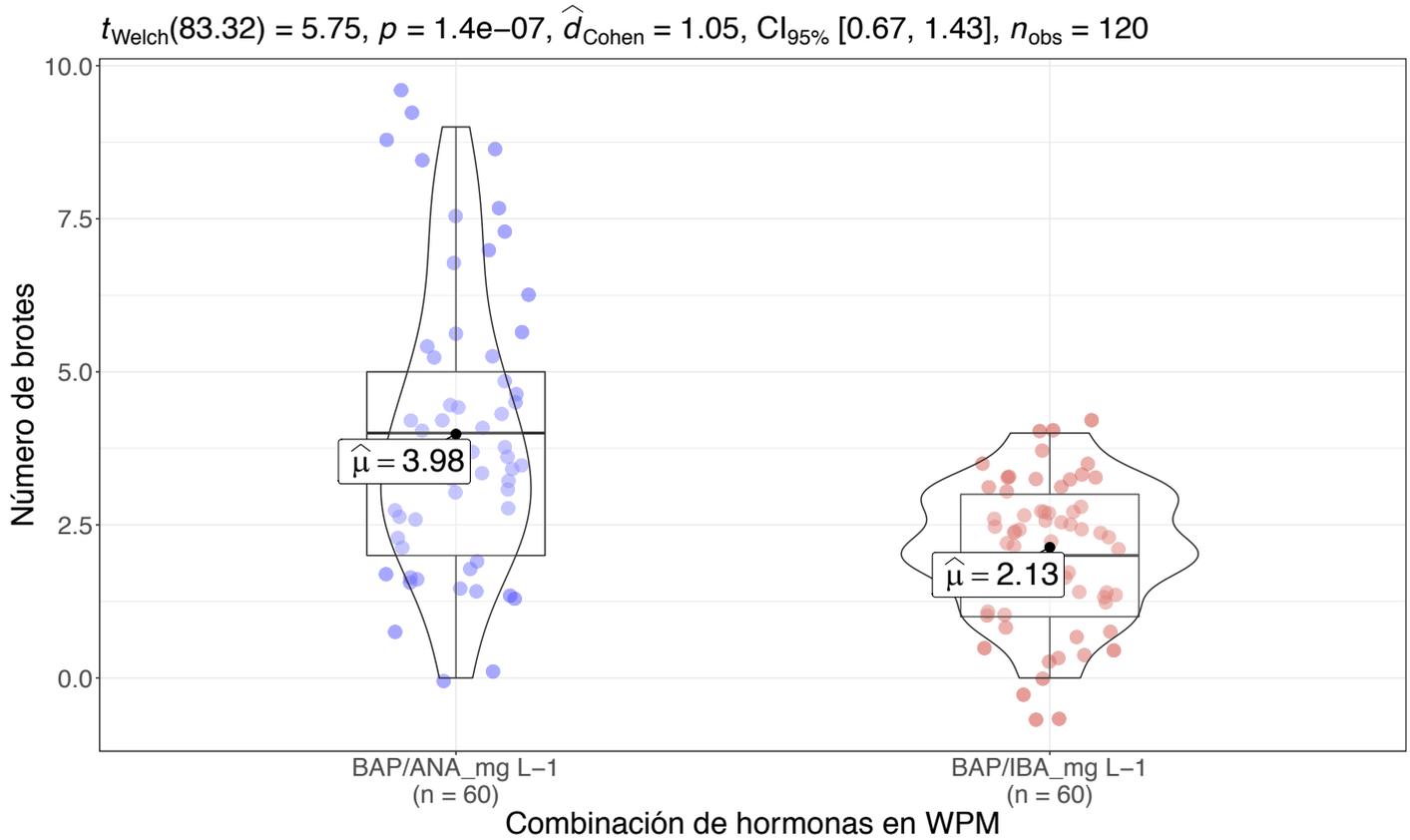


Figura 17. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio WPM comparando combinaciones de hormonas. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza.

La evaluación de los medios de cultivo para la conservación a largo plazo bajo condiciones in vitro demostró que los niveles de sorbitol muestran diferencia estadísticamente significativa mediante la prueba de asociación de variables de Chi cuadrado ($p = 0.036$) con un tamaño de efecto medio ($V_{\text{cramer}} = 0.31$). Dentro de las cuatro concentraciones de sorbitol utilizadas (1, 2, 3 y 4%) sobre el medio MS basal, la concentración de 4% mostró los valores más altos de sobrevivencia (93.3%) mientras que la concentración de 1% mostro los niveles más bajos sobre esta variable de respuesta (53%). El detalle de la evaluación puede observarse en la Figura 18.

$\chi^2_{\text{Pearson}}(3) = 8.57, p = 0.036, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.31, \text{CI}_{95\%} [0.00, 0.51], n_{\text{obs}} = 60$

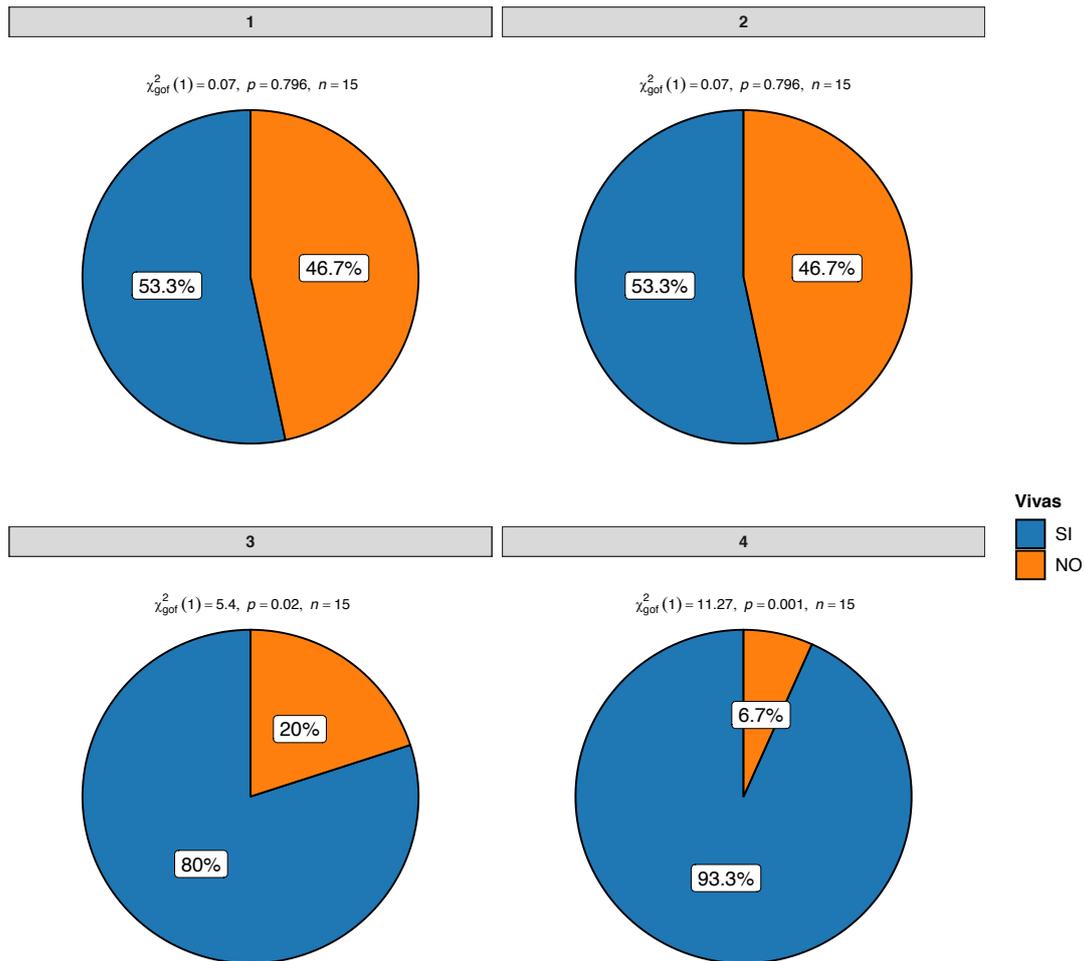


Figura 18. Prueba de Chi cuadrado de los diferentes porcentajes de sorbitol en medio de cultivo MS basal sobre la sobrevivencia de plantas de *Cedrela odorata* para su conservación in vitro.

Al examinar el comportamiento de la sobrevivencia a lo largo de los períodos de tiempo evaluados, se encontró una marcada diferencia estadística ($p = 0.001$), siendo el período de 10 semanas el momento en el cual existieron más plantas vivas (90%) en comparación a la semana 20 (40%). Esto indica claramente que la sobrevivencia disminuye en función del tiempo que la plantas se mantengan bajo condiciones in vitro (Figura 19). Sin embargo, las evaluaciones posteriores demuestran que los niveles de sorbitol tienen una marcada influencia en la sobrevivencia a lo largo del tiempo.

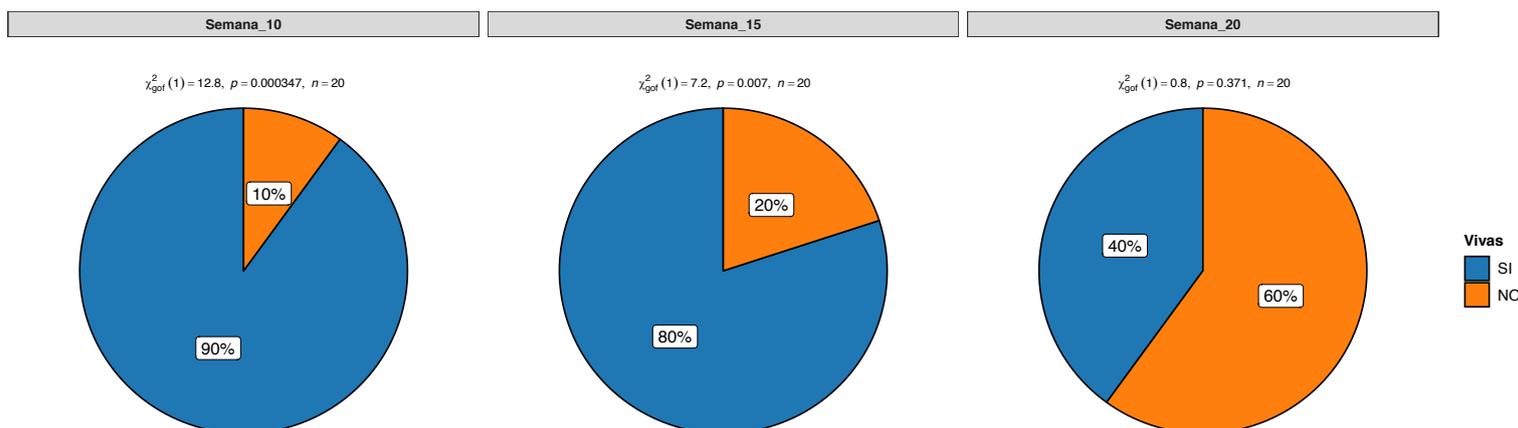
$\chi^2_{\text{Pearson}}(2) = 13.33, p = 0.001, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.44, \text{CI}_{95\%} [0.15, 0.67], n_{\text{obs}} = 60$


Figura 19. Prueba de Chi cuadrado del efecto del tiempo en la sobrevivencia de plantas de *Cedrela odorata* en medio MS basal con diferentes porcentajes de sorbitol para su conservación in vitro.

Al examinar a detalle el comportamiento de las plantas en función de los niveles de sorbitol a lo largo del periodo de evaluación, la prueba de Chi cuadrado evidenció que únicamente la concentración de 3% de sorbitol mostró diferencia significativa en el porcentaje de sobrevivencia de plantas en función de las semanas evaluadas (Figura 20). Para el resto de concentraciones de sorbitol (1, 2 y 4%) el porcentaje de sobrevivencia de plantas no muestra diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, se puede notar que el porcentaje de sobrevivencia a las 20 semanas de evaluación siempre resultó ser menor para las 4 concentraciones de sorbitol.

Al examinar el comportamiento a nivel de concentraciones de sorbitol, es de remarcar que el tratamiento que incluye la suplementación del medio MS basal con 4% de sorbitol, mostró un 100% de sobrevivencia en las semanas 10 y 15 de evaluación y 80% de sobrevivencia en la semana 20 (Figura 20). Por tanto, dicho medio es el más eficiente para la conservación del germoplasma nativo de *C. odorata*.

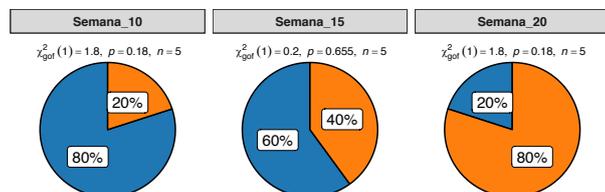
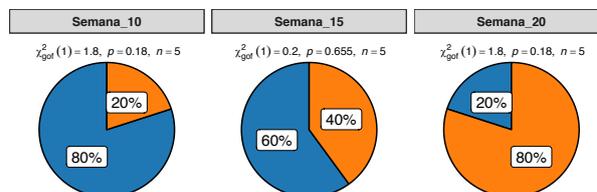
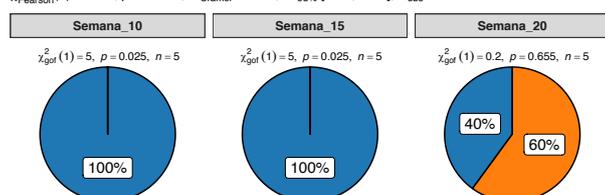
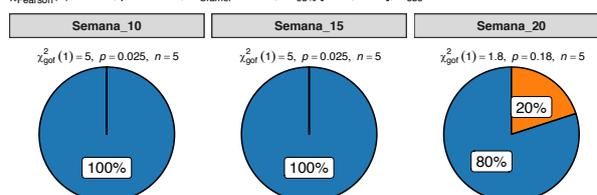
Conservación in vitro de Cedreia odorata
Porcentaje de sorbitol: 1
 $\chi^2_{\text{Pearson}}(2) = 3.75, p = 0.153, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.34, \text{CI}_{95\%} [0.00, 0.76], n_{\text{obs}} = 15$

Porcentaje de sorbitol: 2
 $\chi^2_{\text{Pearson}}(2) = 3.75, p = 0.153, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.34, \text{CI}_{95\%} [0.00, 0.76], n_{\text{obs}} = 15$

Porcentaje de sorbitol: 3
 $\chi^2_{\text{Pearson}}(2) = 7.50, p = 0.024, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.62, \text{CI}_{95\%} [0.00, 1.06], n_{\text{obs}} = 15$

Porcentaje de sorbitol: 4
 $\chi^2_{\text{Pearson}}(2) = 2.14, p = 0.343, \hat{V}_{\text{Cramer}} = 0.00, \text{CI}_{95\%} [0.00, 0.00], n_{\text{obs}} = 15$


Figura 20. Prueba de Chi cuadrado del efecto de la combinación tiempo y la concentraciones de sorbitol sobre medio de cultivo MS basal en la sobrevivencia de plantas de *Cedreia odorata* para su conservación in vitro.

Al examinar el comportamiento de la longitud de la plantas en los medios de cultivo para conservación a largo plazo, se observó una diferencia altamente significativa ($p < .001$) en la longitud para cada una de las concentraciones de sorbitol. El tamaño del efecto fue alto ($\eta^2 p = 067$), lo cual es concordante con la diferencia observada entre las medias de longitud. La mayor y menor longitud de las plantas se observó con la concentraciones de sorbitol de 1 y 4% respectivamente. El detalle de la evaluación se muestra en la Figura 21.

Por otra parte, el comportamiento de la longitud de la plantas en función de las semanas transcurridas también mostro diferencia significativa ($p = .019$), siendo la semana 10 el momento en el cual se obtuvo la menor longitud con una media de 2.35 cm. En contraste, en la semana 20 se obtuvo el mayor valor de longitud con una media de 3.11 como se muestra en la Figura 22.

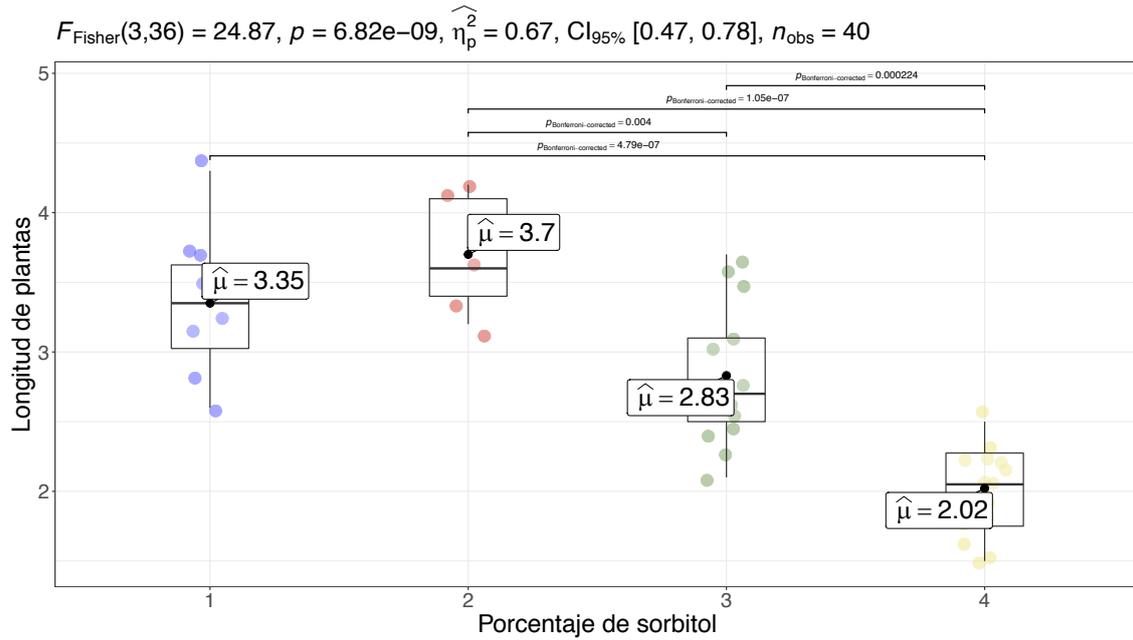


Figura 21. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de *Cedrela odorata* en función a los porcentajes de sorbitol suplementados sobre medio de cultivo MS basal. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

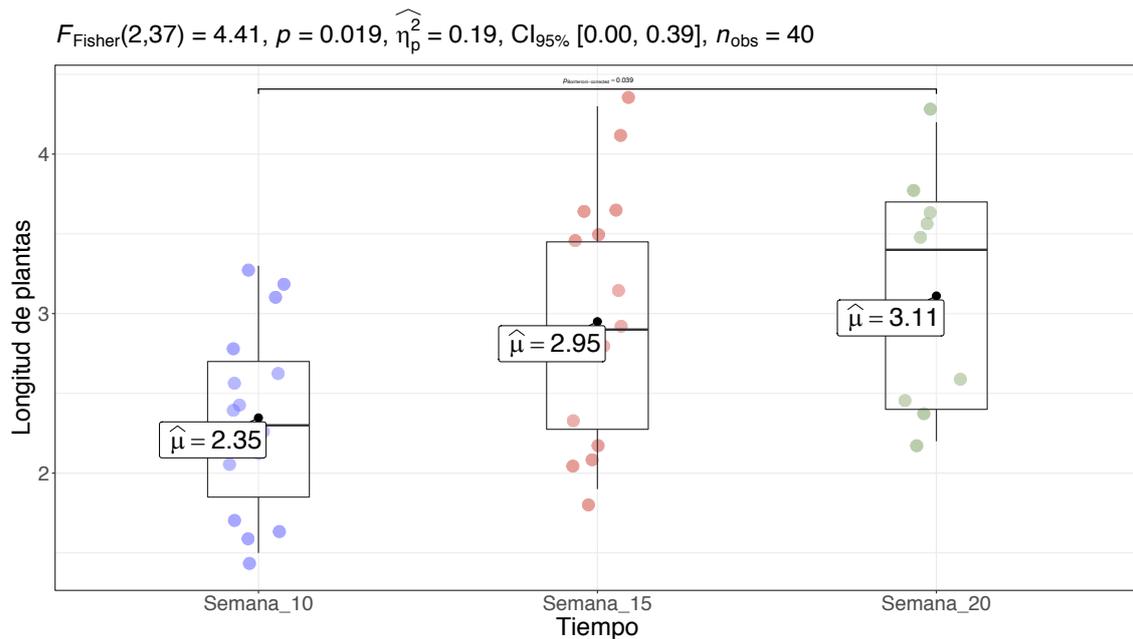


Figura 22. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio MS suplementado con sorbitol en función a las semanas transcurridas desde el establecimiento. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Al profundizar sobre el comportamiento de la longitud de las plantas en función de las semanas transcurridas en la evaluación y el nivel de sorbitol, se observó que para todas las combinaciones de tiempo y concentración existió diferencia altamente significativa ($p < .001$) y un tamaño de efecto de omega cuadrado alto ($\omega^2 p < .8$). Esto supone que las concentraciones de sorbitol producen una marcada diferencia en la respuesta de longitud de las plantas. Para todos los casos de evaluación, la concentración de sorbitol 4% produjo la menor longitud de plantas en los periodos de evaluación como se detalla en la Figura 23.

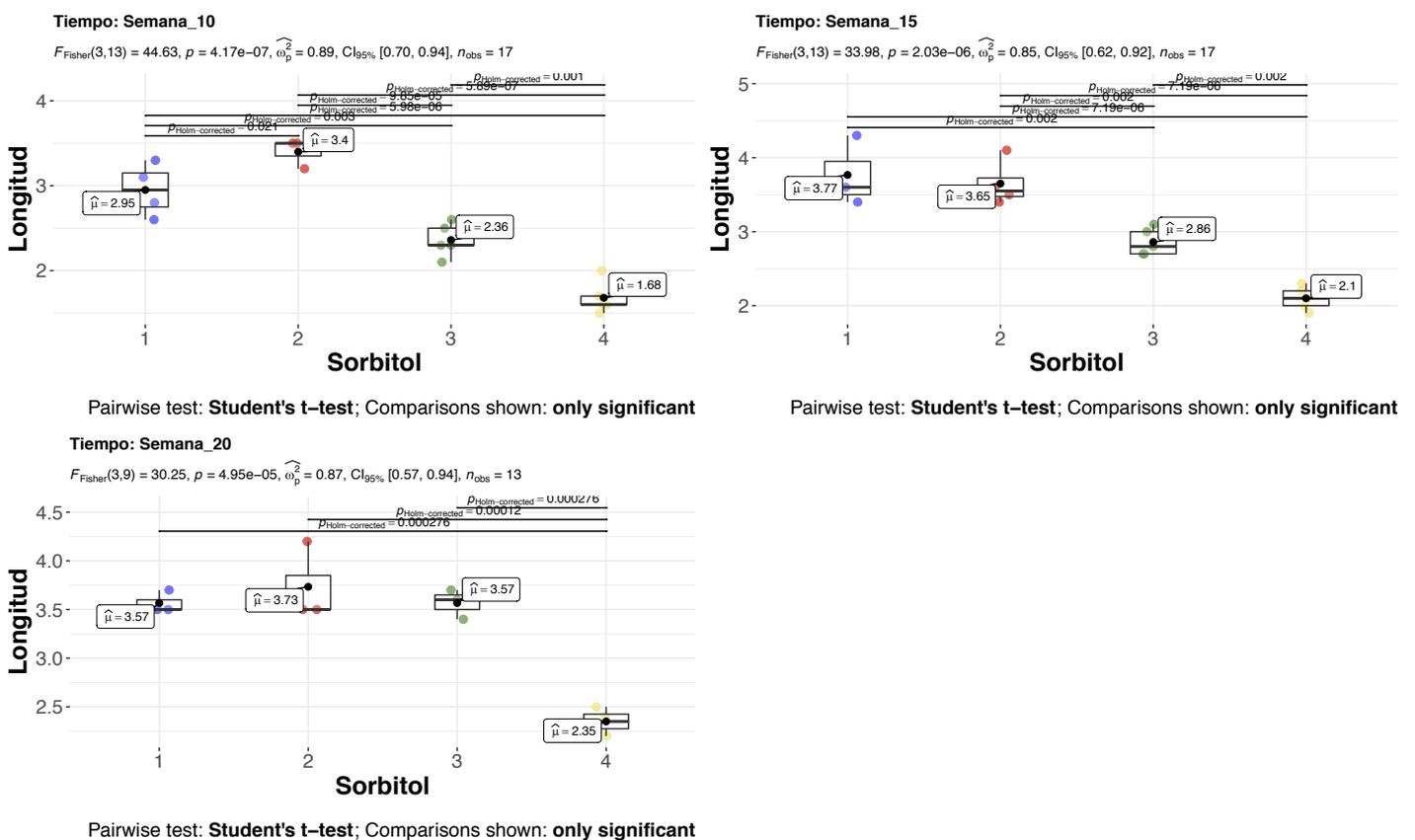


Figura 23. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio MS basal en función de cuatro concentraciones de sorbitol y su efecto a lo largo de las semanas transcurridas desde el establecimiento. Clasificación en función a las semanas transcurridas a partir del establecimiento in vitro. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

Cuando el análisis de la longitud se realizó en función de las semanas transcurridas, haciendo un subagrupamiento a nivel de concentraciones de sorbitol, se observó que a excepción de la concentración de sorbitol 2%, el resto de concentraciones mostraron diferencia significativa ($p < .05$) en la longitud de plantas a lo largo de las semanas transcurridas. El tamaño del efecto fue alto ($\omega^2 p < .5$), para los casos de comparación con diferencia estadística significativa ($p < .05$). De forma general, la longitud de las plantas fue incrementando con el transcurrir de las semanas, obteniéndose los menores valores con la concentración de sorbitol al 4%, lo cual es ideal para la conservación de las plantas de *C. odorata* a largo plazo (Figura 24)

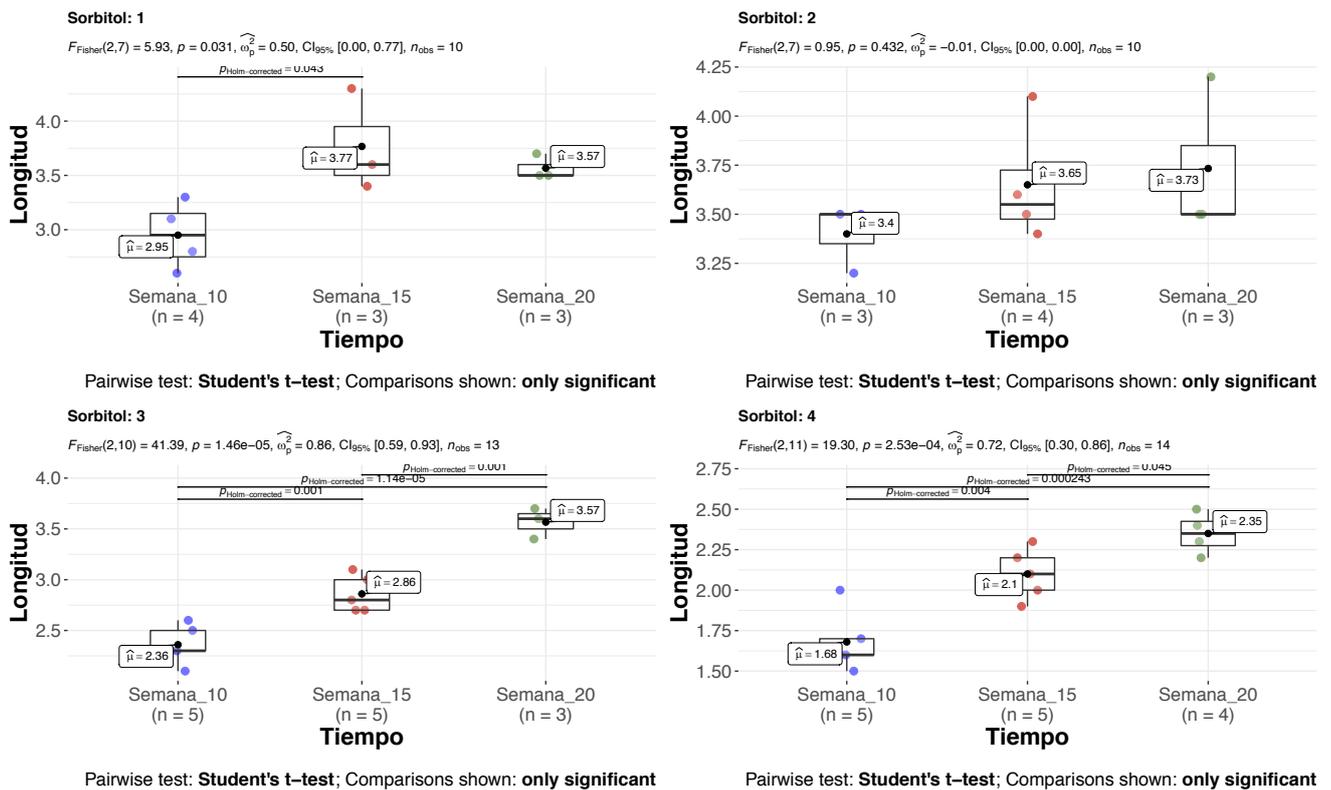


Figura 24. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de *Cedrela odorata* establecidas sobre medio MS basal en función de cuatro concentraciones de sorbitol y su efecto a lo largo de las semanas transcurridas desde el establecimiento. Clasificación en función a las concentraciones de sorbitol. Se muestra el detalle del resultado del análisis de varianza y únicamente las comparaciones por pares de las medias estadísticamente significativas $p < .05$.

16 Análisis y discusión de resultados

En la actualidad, los estudios de diversidad genética pretenden determinar el nivel óptimo entre la utilización de los recursos genéticos y el mantenimiento de la diversidad de las poblaciones naturales (Mayer et al., 2017). Los valores obtenidos sugieren que existe una baja diferenciación genética, aunque estadísticamente significativa ($F_{st} = 0.022$), lo cual difiere con los reportado con otros estudios desarrollados con *C. odorata* en Costa Rica (Gillies et al., 1997), Perú (de la Torre et al., 2008), Nicaragua (Arlen Tijerino et al., 2016) y México (Leshner-Gordillo et al., 2018) en donde se reporta una alta diferenciación entre las poblaciones evaluadas. Esto sugiere que existe un alto flujo genético entre las poblaciones guatemaltecas de *C. odorata* analizadas.

En cuanto a los valores de diversidad genética de las poblaciones, los valores de H_e encontrados en este estudio (0.721) son más altos en comparación a los valores reportados en Costa Rica ($H_e = 0.27$ y $H_e = 0.34$) (Cavers et al., 2003a; Gillies et al., 1997), Nicaragua ($H_e = 0.347$) (Arlen Tijerino et al., 2016), México ($H_e = 0.261$) (Leshner-Gordillo et al., 2018). En cuanto al valor de F_{is} , este se encuentra por debajo de lo reportado para México, sin embargo, el valor encontrado en este estudio sugiere que existe un déficit significativo de heterocigotos. Cuando se compara el valor de F_{is} con otras especies de valor comercial como *Swietenia macrophylla*, se observa que también se presenta un déficit de heterocigotos ($F_{is} = 0.309$) y una baja diferenciación genética ($F_{st} = 0.095$).

Este déficit de heterocigotos puede deberse a la fragmentación del hábitat y deforestación a la que están expuestas las especies maderables con alto valor comercial, así como a la extracción selectiva de individuos con características fenotípicas deseables, produciendo la erosión genética de las especies (Frankham et al., 2004).

Los valores de diversidad encontrados en este estudio son similares a los descritos para *C. balansae* en Argentina ($H_e = 0.643$), al igual que la baja diferenciación poblacional ($F_{st} = 0.041$), mientras que el valor de migrantes N_m fue de 4.47. Esto indica que existe un mecanismo eficiente de dispersión a media y larga distancia que permite niveles relativamente altos de flujo genético, a pesar de que existan sistemas fragmentados (Lowe et al., 2005). Sin embargo, la cantidad de flujo genético por sí sola no previene de los efectos negativos del aislamiento poblacional, como la depresión

endogámica o disminución de diversidad, siendo importante la varianza genética y diferenciación respecto a la población receptora (Nora et al., 2011).

La alta varianza encontrada dentro las poblaciones de *C. odorata* tras el AMOVA (97%) es similar al valor reportado en las poblaciones de Nicaragua (86.19%) (Arlen Tijerino et al., 2016). En las poblaciones de Costa Rica el valor de varianza entre las poblaciones fue de 78.9% y 20% entre poblaciones, existiendo mayor diferenciación poblacional que lo encontrado en este estudio. La baja diferenciación encontrada en este estudio concuerda con el hecho de que en el norte de Guatemala, únicamente se ha reportado la presencia del haplotipo 1 de *C. odorata* (Cavers et al., 2003b). Para el caso de las poblaciones peruanas, el valor de varianza dentro de poblaciones (72.7%) menor al encontrado en Guatemala, mientras que el valor de $F_{st} = 0.20$ reafirma la diferenciación poblacional en Perú (de la Torre et al., 2008).

La alta conectividad entre las poblaciones queda confirmado con el análisis de STRUCTURE, el cual demuestra que no se presenta aislamiento genético de las poblaciones, ya que cada individuo analizado muestra material genético común para todas las poblaciones. A pesar que la zona de estudio está sujeta a la extracción ilegal de *C. odorata*, es probable que los mayores efectos negativos de la fragmentación, como la pérdida de diversidad genética y fijación de alelos, sea más evidente en las próximas generaciones (da Silva et al., 2008). Sin embargo, los valores significativos de F_{is} encontrados en el estudio, sugieren que los efectos de la erosión genética empiezan a ser evidentes. A pesar de los presentes esfuerzos por reducir la extracción ilegal en la Sierra del Lacandón, es necesario evitar que los tamaños poblacionales se reduzcan para disminuir el riesgo de erosión genética por efecto de la deriva genética, evitando así una grave depauperación genética (Szczecińska et al., 2016).

Finalmente, aunque la zona de estudio ha sido afectada por la extracción ilegal de *C. odorata*, los valores de diversidad genética encontrados son mayores a la reportados en países como México, Nicaragua, Costa Rica y Perú. Sin embargo, el estudio también revela un déficit significativo de heterocigotos, lo cual es el resultado de la disminución del tamaño poblacional, quedando así las poblaciones de *C. odorata* más expuestas a los efectos negativos de la deriva genética. La baja diferenciación poblacional sugiere una alta conectividad a través del genético entre las poblaciones. Aún así, este flujo genético podría no ser suficiente para evitar la erosión genética a futuro, ya que los efectos en la reducción poblacional pueden ser más evidentes en las próximas generaciones. Por tanto,

se sugiere el resguardo del recurso genético contenido en las poblaciones naturales de *C. odorata* en el parque nacional Sierra del Lacandón, ya que este representa un amplio reservorio genético que será la base para la adaptación y aprovechamiento de la especie.

En cuanto a las condiciones para la propagación in vitro, la mejor concentración de BAP para la inducción de brotes (2.5 mgL^{-1}) estuvo dentro del rango reportado para especies de género *Cedrela*. En el establecimiento de *C. salvadorensis*, se reporta que las concentraciones de 2.5 y 3.0 3.5 mgL^{-1} dieron los mejores resultados para la inducción de brotes (Soto-Vargas et al., 2010). Otros estudios reportan que el uso de BAP a una concentración de 2.0 como ideal para el establecimiento y multiplicación in vitro de *C. odorata* (Pérez-Flores et al., 2012). Respecto al uso de ANA, la dosis de 2.5 y 3 resultan ser similares a las reportadas en otros estudios para el establecimiento in vitro de *C. odorata* (García-González et al., 2011). En cuanto al uso de IBA para el establecimiento in vitro las dosis de 0.5 y 1.0 mgL^{-1} han sido reportadas como exitosas en especies del género *Cedrela* (Basto et al., 2012). Esto concuerda con la dosis de 1.0 identificada como óptima para el establecimiento de *C. odorata*, sin embargo, los resultados siempre mostraron mayor eficiencia con el uso de ANA en combinación con BAP.

Respecto al efecto de sorbitol para la conservación in vitro a largo plazo, la dosis de 4% es consistente con lo reportado para otras especies tanto leñosas como herbáceas (Ciobanu & Constantinovici, 2013; Skalova et al., 2013). Sin embargo, también existen reportes sobre el uso de concentraciones más bajas como 2% (El-Bahr et al., 2016) aunque el período de evaluación no excedió la 10 semanas, a diferencia de este estudio que prolongo la evaluación hasta 20 semanas. Las longitudes de las diversas especies in vitro expuestas a sorbitol manifiestan una reducción en el crecimiento longitudinal directamente proporcional a la concentración de sorbitol utilizada (Millán-Orozco et al., 2011). La recomendación para la conservación in vitro del germoplasma nativo guatemalteco de *C. odorata* es el uso de un medio MS basal suplementado con 4% de sorbitol, lo cual garantiza la sobrevivencia de al menos el 80% de las plantas hasta un periodo de 20 semanas. Posterior a este momento, se recomienda realizar un trasplante a un nuevo medio con las mismas características para continuar con el proceso de conservación.

17 Conclusiones

1. Las poblaciones de cedro nativo guatemalteco presentaron un bajo nivel de diferenciación, presentando un valor de $F_{st} = 0.022$, indicando que existe un alto flujo genético entre las poblaciones, las cuales no presentan un aislamiento genético por distancia. El porcentaje de la variación molecular debido a la diferencia entre las poblaciones fue de 3%, mientras que la variación dentro de las poblaciones fue de 97%. El análisis de inferencia bayesiana mostró que la estructura poblacional más probable es bajo un arreglo de cuatro clusters.
2. Las poblaciones analizadas mostraron un rango de riqueza alélica entre 5.4 y 8.2 alelos por locus, siendo las poblaciones localizadas al sur de la Sierra las poblaciones con los valores más altos. El índice de diversidad de Shannon estuvo en el rango de 1.316 a 1.699 siendo las poblaciones del centro y sur del área de estudio las más diversas. En cuanto a los valores de endogamia, las cuatro poblaciones mostraron valores estadísticamente significativos en cuanto a la falta de heterocigotos.
3. El medio de cultivo MS suplementado con 2 y 3mg L⁻¹ de BAP y ANA, respectivamente, fue el más eficiente para el desarrollo de brotes en los explantes de cedro. En cuanto a la conservación a largo plazo, con el medio MS basal suplementado con 4% de sorbitol se obtuvieron los rangos de longitud más bajos y el porcentaje de sobrevivencia de plantas más alto hasta las 20 semanas de evaluación.

18 Impacto esperado

Se ha esclarecido la estructura y diversidad genética de las poblaciones de cedro nativo en el Parque Nacional Sierra de Lacandón. El alto grado de diversidad genética encontrado en los genotipos estudiados sustenta la necesidad de seguir apoyando los esfuerzos para evitar la extracción ilegal de madera de cedro en la zona. A pesar de que los índices de diversidad exhiben una alta riqueza de este recurso fitogenético, los indicios

de endogamia son sensibles, por lo cual debe evitarse la abrupta reducción del tamaño poblacional para que el recurso no se vea degradado en términos genéticos.

Los resultados encontrados en este estudio constituyen un sustento científico para continuar apoyando las estrategias de conservación en zonas de alta diversidad genética como la Sierra del Lacandón. También, a través del establecimiento in vitro, se cuenta con una colección que resguarda algunos de los genotipos altamente diversos, los cuales serán la base para futuros procesos de restauración y/o mejoramiento de la especie.

19 Referencias

- Al-Samarai, F. R., & Al-Kazaz, A. (2015). Molecular markers: an introduction and application. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130. doi:10.13187/ejmb.2015.9.118
- Almendarez, E., Orozco, L., & López, A. (2013). Existencias de especies maderables y frutales en fincas de Waslala, Nicaragua. *Agroforestería En Las Américas*, 49, 68–77.
- Basto, S., Serrano, C., & de Jaramillo, E. H. (2012). Effects of donor plant age and explants on in vitro culture of *Cedrela montana* Moritz ex Turcz. *Universitas Scientiarum*, 17(3), 263–271. doi:10.11144/javeriana.SC17-3.eodp
- Baucom, R. S., Estill, J. C., & Cruzan, M. B. (2005). The effect of deforestation on the genetic diversity and structure in *Acer saccharum* (Marsh): Evidence for the loss and restructuring of genetic variation in a natural system. *Conservation Genetics*, 6, 39–50. doi:10.1007/s10592-004-7718-9
- Bougard, S., & Dray, S. (2018). Supervised multiblock analysis in R with the ade4 package. *Journal of Statistical Software*, 86(1), 1–17. doi:10.18637/jss.v086.i01
- Cabrero, J., & Camacho, J. P. (2002). Fundamentos de genética de poblaciones. In M. Soler (Ed.), *Evolución: la base de la biología* (pp. 83–126). Proyecto Sur.
- Cavers, S., Navarro, C., & Lowe, A. J. (2003a). A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics*, 4(5), 571–580.
- Cavers, S., Navarro, C., & Lowe, A. J. (2003b). Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology*, 12(6), 1451–1460. doi:10.1046/j.1365-

294X.2003.01810.x

- Cavers, S., Navarro, C., & Lowe, A. J. (2004). Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. *Forest Ecology and Management*, 197, 285–294.
- Cintrón, B. B. (2000). *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. In J. Francis & C. Lowe (Eds.), *Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales* (pp. 128–134). Instituto Internacional de Dasonomía Tropical.
- Ciobanu, I. B., & Constantinovici, D. (2013). The Effect of sorbitol and conservation period on the in vitro evolution of *Solanum Tuberosum* L. plantlets. *Cercetari Agronomice in Moldova*, 45(3), 79–86. doi:10.2478/v10298-012-0058-x
- Cordero, J., Mesén, F., Montero, M., Steward, J., Boshier, D., Chamberlain, J., Pennington, T., Hands, M., Hughes, C., & Detlefsen, G. (2003). Descripción de especies de árboles nativos de América Central. In J. Cordero & D. Boshier (Eds.), *Árboles de Centroamérica: Un manual para extensionistas. s. 1* (pp. 447–452). OFI/CATIE.
- Curtis, R. A., Barnes, N., Schnek, A., & Massarini, A. (2006). *Invitación a la biología* (6th ed.). Editorial Médica Panamericana.
- da Silva, E., de Oliveira, C., Lins-e-silva, A., & Rodal, M. (2008). Diversity and genetic structure of natural fragmented populations of *Tapirira guianensis* Aubl. in Northeastern Brazil. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 2, 35–40.
- Davies, S. J., Cavers, S., Finegan, B., White, A., Breed, M. F., & Lowe, A. J. (2013). Pollen flow in fragmented landscapes maintains genetic diversity following stand-replacing disturbance in a neotropical pioneer tree, *Vochysia ferruginea* Mart. *Heredity*, 115, 125–129.
- de la Torre, A., López, C., Yglesias, E., & Cornelius, J. P. (2008). Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management*, 255, 334–339.
- de Mendiburu, F. (2020). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.3-3. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=agricolae>
- Earl, D. A., & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361. doi:10.1007/s12686-011-9548-7

- El-Bahr, M. K., Abd EL-Hamid, A., Matter, M. A., Shaltout, A., Bekheet, S. A., & El-Ashry, A. (2016). In vitro conservation of embryogenic cultures of date palm using osmotic mediated growth agents. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, *14*(2), 363–370. doi:10.1016/j.jgeb.2016.08.004
- Ellstrand, N. C., & Elam, D. R. (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *24*, 217–242.
- Esquivel, M. J., Harvey, C., Finegan, B., Casanoves, F., Skarpe, C., & Nieuwenhuys, A. (2009). Regeneración natural de árboles y arbustos en potreros activos de Nicaragua. *Agroforestería En Las Américas*, *47*, 76–84.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, *14*, 2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L., Smouse, P., & Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, *131*, 479–491.
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Gallo, L. A., Marchelli, P., Chauchard, L., & González-Peñalba, M. (2009). Knowing and doing: Research leading to action in the conservation of forest genetic diversity of patagonian temperate forests. *Conservation Biology*, *23*(4), 895–898. doi:10.1111/j.1523-1739.2009.01210.x
- García-González, R., Delgado, M., González, Y., González, A., Garriga, M., Caligari, P., Carrasco, B., & Quiroz, K. (2011). In vitro propagation of cedar (*Cedrela odorata* L.) from juvenile shoots. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *71*(3), 376–382.
- Gemayel, R., Cho, J., Boeynaems, S., & Verstrepen, K. J. (2012). Beyond junk-variable tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes*, *3*, 461–480.
- Gillies, A. C. M., Cornelius, J. P., Newton, A. C., Navarro, C., Hernández, M., & Wilson, J. (1997). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology*, *6*(12), 1133–1145. doi:10.1046/j.1365-294X.1997.00287.x
- Goudet, J. (1995). Computer Note Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal*

of Heredity, 86, 485–486.

- Hanson, T. R., Brunfeldt, S. J., Finegan, B., & Waits, L. P. (2008). Pollen dispersal and genetic structure of the tropical tree *Dipteryx panamensis* in a fragmented Costa Rican landscape. *Molecular Ecology*, 17, 2060–2073. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03726.x
- Hernández, G., Buonamici, A., Walker, K., Vendramin, G. G., Navarro, C., & Cavers, S. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. *Conservation Genetics* 2, 9(2), 457–459. doi:10.1007/s10592-007-9334-y
- Hubisz, M. J., Falush, D., Stephen, M., & Pritchard, J. K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology*, 9, 1322–1332. doi:10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x
- Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806. doi:10.1093/bioinformatics/btm233
- Jombart, T. (2008). Adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. doi:10.1093/bioinformatics/btn129
- Jonah, P. M., Bello, L. L., Lucky, O., Midau, A., & Moruppa, S. M. (2011). Review : The importance of molecular markers in plant breeding programmes. *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5), 4–12.
- Leshner-Gordillo, J. M., Martínez-Sánchez, J. L., Orduña-Rodas, P., & Hernández-Carreta, A. I. (2018). Diversidad genética del cedro rojo (*Cedrela odorata*) en el estado de Tabasco, México. *Bosque*, 39(3), 411–417. doi:10.4067/S0717-92002018000300411
- Loo, J. A. (2011). *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad genética*. Conafor.
- Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. E., & Navarro, C. (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, 95(4), 255–273. doi:10.1038/sj.hdy.6800725
- Mayer, M., Unterseer, S., Bauer, E., de Leon, N., Ordas, B., & Schön, C. C. (2017). Is there an optimum level of diversity in utilization of genetic resources? *Theoretical*

- and Applied Genetics*, 130(11), 2283–2295. doi:10.1007/s00122-017-2959-4
- Millán-Orozco, L., Corredoira, E., & San José, M. (2011). In vitro rhizogenesis: histoanatomy of *Cedrela odorata* (Meliaceae) microcuttings. *Revista de Biología Tropical*, 59(1), 447–453.
- Muellner, A. N., Pennington, T., & Chase, M. (2009). Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of “*Cedrela odorata*.” *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52, 461–469.
- Navarro, C., Montagnini, F., & Hernández, G. (2004). Genetic variability of *Cedrela odorata* Linnaeus: results of early performance of provenances and families from Mesoamerica grown in association with coffee. *Forest Ecology and Management*, 192, 217–227. doi:10.1016/j.foreco.2004.01.037
- Navarro, C., Ward, S., & Hernández, M. (2002). The tree *Cedrela odorata* (Meliaceae): a morphologically subdivided species in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 50(1), 21–29.
- Nora, S., Albaladejo, R. G., González-Martínez, S. C., Robledo-Amuncio, J., & Aparicio, A. (2011). Movimiento de genes (polen y semillas) en poblaciones fragmentadas de plantas. *Ecosistemas*, 20(2), 35–45. doi:10.7818/re.2014.20-2-3.00
- Patil, I. (2018). ggstatsplot: 'ggplot2' Based Plots with Statistical Details. CRAN. Recuperado de: <https://cran.r-project.org/web/packages/ggstatsplot/index.html>
- Paredes-Villanueva, K., Arjen de Groot, G., Laros, I., Bovenschen, J., Bongers, F., & Zuidema, P. (2019). Genetic differences among *Cedrela odorata* sites in Bolivia provide limited potential for fine-scale timber tracing. *Tree Genetics and Genomes*, 15(33), 1–11. doi:10.1007/s11295-019-1339-4
- Peakall, R., & Smouse, P. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288–295.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2015). *Appendix 1—Methods and Statistics in GenAlEx 6.1*. The Australian National University.
- Peña-Ramírez, Y., García-Sheseña, I., Hernández-Espinoza, Á., Domínguez-Hernández, A., Barredo-Pool, F., González-Rodríguez, J., & Robert, M. (2011). Induction of

- somatic embryogenesis and plant regeneration in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L . (Meliaceae)]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105, 203–209. doi:10.1007/s11240-010-9853-y
- Peña-Ramírez, Y., Juárez-Gómez, J., Gómez-López, L., Jerónimo-Pérez, J., García-Sheseña, I., González-Rodríguez, J., & Robert, M. L. (2010). Multiple adventitious shoot formation in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L .) cultured in vitro using juvenile and mature tissues : an improved micropropagation protocol for a highly valuable tropical tree species. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 46, 149–160. doi:10.1007/s11627-010-9280-0
- Pérez-Flores, J., Aguilar-Vega, M. E., & Tripepi-Roca, R. (2012). Assays for in vitro establishment of *Swietenia macrophylla* and *Cedrela odorata*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 20–30.
- Pérez-Jiménez, M., Besnard, G., Dorado, G., & Hernández, P. (2013). Varietal tracing of virgin olive oils based on plastid DNA variation profiling. *PLoS ONE*, 8:e70507.
- Phumichai, C., Phumichai, T., & Wongkaew, A. (2015). Novel chloroplast microsatellite (cpSSR) marker for genetic diversity assesment of cultivated and wild *Hevea* rubber. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33, 1486–1498.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Rambaut, A. (2008). *FigTree v1.1.1: Tree figure drawing tool*.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
- Rojas-Rodríguez, F., & Torres-Córdoba, G. (2013). Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción cedro amargo (*Cedrela odorata* L.). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 11(26), 25–27.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x
- Ryan, P. D., Hammer, Ø., & Harper, D. A. (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 5–7. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025

- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution Biol Evo*, 4(4), 406–425. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454
- Semagn, K., Bjørnstad, Å., & Ndjiondjop, M. N. (2006). An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology*, 5(25), 2540–2568.
- Skalova, I., Viehmannova, I., & Vitamvas, J. (2013). In vitro conservation of *Smalanthus sonchifolius* under slow-growth conditions. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 45(3), 147–150. doi:10.2478/v10295-012-0024-5
- Soto-Vargas, B., Valverde-Cerdas, L., Rojas-Vargas, A., & Hine-Gómez, A. (2010). Establecimiento in vitro de *Cedrela salvadorensis* Standl. *Tecnología En Marcha*, 23(4), 66–73.
- Szczecińska, M., Sramko, G., Wołosz, K., & Sawicki, J. (2016). Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in east Central Europe. *PLoS ONE*, 11(3), 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0151730
- Teixeira, J. A., Winarto, B., Dobránszki, J., & Zeng, S. (2015). Disinfection procedures for in vitro propagation of *Anthurium*. *Folia Horticulturae*, 27(1), 3–14. doi:10.1515/fhort-2015-0009
- Thomas, E., Jalonen, R., Loo, J., Boshier, D., Gallo, L., Cavers, L., Bordács, S., Smith, P., & Bozzano, M. (2014). Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. *Forest Ecology and Management*, 333, 66–75. doi:10.1016/j.foreco.2014.07.015
- Tijerino, A., Callejas, L., & Cerda-Granados, D. A. (2016). Evaluación de la diversidad genética de cinco poblaciones nicaragüenses de *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) usando marcadores RAPDs. *Encuentro*, 103, 28–39. doi:10.5377/encuentro.v0i103.2690
- Tijerino, Arlen, Callejas, L., & Cerda-Granados, D. A. (2016). Assessment of genetic diversity in five Nicaraguan populations of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) using RAPD markers. *Encuentro*, 103, 28–39. doi:10.5377/encuentro.v0i103.2690
- Wang, J. (2017). The computer program structure for assigning individuals to populations: easy to use but easier to misuse. *Molecular Ecology Resources*, 17, 981–990. doi:10.1111/1755-0998.12650
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-Statistics for the analysis of

population structure. *Evolution*, 38(6), 1358–1370. doi:10.2307/2408641

Wright, S. (1965). The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, 19, 395–420.

Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413–418.

Zamora, V. N. (2002). *Árboles de la Mosquitia hondureña: descripción de 150 especies* (p. 314). CATIE.

20 Apéndices

Listado de los integrantes del equipo de investigación (en una sola hoja)

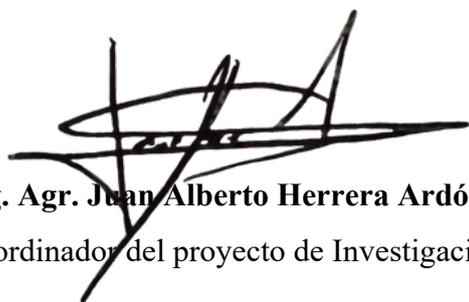
Contratados por contraparte y colaboradores

Nombre	Firma
Juan Alberto Herrera Ardón	
José Alejandro Ruiz Chután	

Contratados por la Dirección General de Investigación

Nombre	Categoría	Registro de Personal	Pago		Firma
			SI	NO	
Julio Ernesto Berdúo Sandoval	Investigador	20101438			

Guatemala ____ 26 ____ de febrero ____ 2021 ____



Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón
 Coordinador del proyecto de Investigación



Ing. Agr. Saúl Guerra Gutiérrez
 Programa Universitario de Investigación
 En Recursos Naturales y Ambiente



Ing. Agr. MARN. Julio Rufino Salazar
 Coordinador General de Programas