

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

(nombre del programa universitario de investigación de la Digi)

Diversidad genética de *Dalbergia stevensonii* en la Franja Transversal del Norte y Petén: bases para su conservación y mejoramiento

nombre del proyecto de investigación

B14-2022

código del proyecto de investigación

Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales

unidad académica o centro no adscrito a unidad académica avaladora

José Alejandro Ruiz Chután

nombre del coordinador del proyecto y equipo de investigación contratado por Digi

Guatemala 28 de febrero de 2023

Autoridades

Dra. Alice Patricia Burgos Paniagua
Director General de Investigación

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

MSc. Andera Eunice Rodas Morán
Coordinadora del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente

Autores

José Alejandro Ruiz Chután^{1,2}
Coordinador del proyecto

Julio Ernesto Berdúo Sandoval¹
Gregorio Amílcar Sánchez Pérez¹
Carlos Enrique Villanueva González³
Marie Kalousová²
Bohdan Lojká²
Myrna Ethel Herrera Sosa¹
Colaboradores

Facultad de Agronomía, Instituto de Investigaciones Agronómicas y Ambientales¹
Department of Crop Sciences and Agroforestry, Czech University of Life Sciences Prague²
Facultad de Ciencias Ambientales y Agrícolas, Universidad Rafael Landívar, Campus San Pedro
Claver S.J., San Juan Chamelco, Alta Verapaz, Guatemala³

Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (Digi), 2022. El contenido de este informe de investigación es responsabilidad exclusiva de sus autores.

Esta investigación fue cofinanciada con recursos del Fondo de Investigación de la Digi de la Universidad de San Carlos de Guatemala a través de la partida 4.8.63.0.29 en el Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas.

Los autores son responsables del contenido, de las condiciones éticas y legales de la investigación desarrollada.

1 Índice General

1	Índice General	3
2	Resumen	7
3	Introducción.....	9
4	Planteamiento del problema	11
5	Delimitación en tiempo y espacio	12
5.1	Delimitación en tiempo	12
5.2	Delimitación espacial	12
6	Marco teórico.....	12
6.1	Situación de los recursos forestales en Guatemala.....	12
6.2	Descripción de la especie <i>Dalbergia stevensonii</i> Standl.	13
6.3	Situación actual de <i>D. stevensonii</i> en Guatemala	13
6.4	Diversidad genética y su importancia en especies amenazadas	14
6.5	Factores implicados en la diversidad genética	15
6.6	Marcadores moleculares como herramienta para determinar la diversidad genética	15
6.7	Marcador molecular de tipo Microsatélite (SSR).....	16
7	Estado del arte	16
7.1	Diversidad genética de <i>Dalbergia spp</i>	16
8	Objetivos.....	18
	General	18
9	Hipótesis	18

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

10	Materiales y métodos.....	18
10.1	Enfoque de la investigación.....	18
10.2	Recolección de la información	18
10.3	Técnicas e instrumentos	20
10.4	Procesamiento y análisis de la información	22
	Diversidad genética	22
11	Resultados.....	24
11.1	Polimorfismo de los marcadores microsatélites	24
11.2	Diversidad genética en las poblaciones de <i>D. stevensonii</i>	25
11.3	Estructura poblacional de <i>D. stevensonii</i>	27
11.4	Conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro	32
12	Discusión	¡Error! Marcador no definido.
13	Discusión	36
13.1	Diversidad genética de <i>D. stevensonii</i>	36
13.2	Diferenciación genética y estructura de poblacional.....	37
13.3	Conservación	38
13.4	Establecimiento in vitro.....	39
14	Conclusiones.....	40
15	Referencias	41
16	Vinculación.....	49
17	Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual.....	49
18	Aporte de la propuesta de investigación a los ODS	49

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

19	Orden de pago final	49
20	Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación	50
21	Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario.....	50
22	Visado de la Dirección General de Investigación	51

Índice de tablas

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados para el genotipado de <i>D. stevensonii</i>	21
Tabla 2. Estadísticas de diversidad de los 12 loci SSR en 90 muestras de <i>D. stevensonii</i>	24
Tabla 3. Resumen de los diferentes estadísticos de diversidad poblacional de <i>D. stevensonii</i> promediados sobre los 12 loci SSR.	25
Tabla 4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis poblaciones de <i>D. stevensonii</i>	26
Tabla 5. Índice de diferenciación genética por pares (F_{st}) entre las seis poblaciones. Valores por debajo de la diagonal.....	26

Índice de figuras

Figura 1. Mapa de poblaciones muestreadas. Un total de 90 arboles de <i>D. stevensonii</i> fueron muestreados en seis poblaciones geográficas.....	19
Figura 2. Resultados del análisis STRUCTURE para 90 individuos de <i>D. stevensonii</i> basados en datos de 12 microsatélites..	28
Figura 3. Estructura genética poblacional, obtenida a partir de un análisis DAPC, de 90 individuos de <i>D. stevensonii</i> provenientes de seis poblaciones silvestres.	29
Figura 4. A) BIC para inferir el número más probable de grupos genéticos ($K = 3$). B) Diagrama de dispersión DAPC de los 90 individuos de <i>D. stevensonii</i> agrupados en 3 grupos genéticos. C) Representación de diagrama de barras de los resultados de DAPC.	30

Figura 5. Relaciones entre las sies poblaciones silvestres de *D. stevensonii* en Guatemala. (A) Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la comparación por pares FST. (B) Árbol UPGMA basado en la distancia genética de Nei entre sies poblaciones de *D. stevensonii*.....31

Figura 6. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *D. stevensonii* establecidos sobre medio MS y WPM.32

Figura 7. Diagrama de cajas del número de brotes de plantas in vitro de *D. stevensonii* establecidas sobre medio WPM comparando combinaciones de hormonas.....33

Figura 8. Prueba de Chi cuadrado de A) diferentes porcentajes de sorbitol en medio de cultivo MS basal y B) efecto del tiempo sobre la sobrevivencia de plantas de *D. stevensonii* para su conservación in vitro.34

Figura 9. Diagrama de cajas de la longitud de plantas de *D. stevensonii* en función a A) porcentajes de sorbitol suplementados sobre medio de cultivo MS basal y B) semanas transcurridas desde el establecimiento in vitro.35

2 Resumen

Dalbergia stevensonii Standl es una especie en peligro debido a la sobreexplotación que ha sufrido en las últimas décadas. La diversidad genética es fundamental para asegurar la supervivencia a largo plazo de las especies y es importante en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, los conocimientos sobre la diversidad genética de *D. stevensonii* son limitados, ya que no se ha realizado ningún estudio para estimar la variabilidad de las poblaciones. Este estudio es el primero en determinar la diversidad y estructura genética de poblaciones silvestres de *D. stevensonii*, utilizando marcadores moleculares. Se evaluó la diversidad genética de 90 árboles silvestres de *D. stevensonii* procedentes de seis poblaciones localizadas en su área de distribución natural. La diversidad genética resultó ser moderada, con un promedio de 5.83 alelos por locus y un valor medio del índice de Shannon de 1.42, una heterocigosidad observada de 0.32 y una heterocigosidad esperada de 0.37. La heterocigosidad esperada varió entre poblaciones, siendo la más alta de 0.46 en Lachuá y la más baja de 0.25 en Cahabón. El análisis de la varianza molecular mostró que solo el 6% de la variación genética se daba entre poblaciones, y los valores de F_{st} por pares indicaron una diferenciación moderada entre poblaciones. El análisis de STRUCTURE reveló la existencia de tres conglomerados para las 90 muestras, y las seis poblaciones se separaron en tres conglomerados distintos. Con el medio de cultivo MS suplementado con 4% de sorbitol se obtuvo un 80% de supervivencia de plantas a las 20 semanas. La conservación de la diversidad genética de *D. stevensonii* es fundamental para asegurar su supervivencia a largo plazo y para el éxito de los programas de mejoramiento genético. Estos hallazgos proporcionan una base genética crucial para la conservación, gestión y restauración de esta especie endémica.

Palabras clave: *Dalbergia stevensonii*, estructura poblacional, diversidad genética, microsatélites, colección núcleo.

Abstract

Dalbergia stevensonii Standl is an endangered species due to overexploitation in recent decades. Genetic diversity is essential to ensure the species' long-term survival and is vital in breeding programs. However, knowledge on the genetic diversity of *D. stevensonii* is limited, as no study has been conducted to estimate population variability. This study is the first to determine the genetic diversity and structure of wild populations of *D. stevensonii* using molecular markers. The genetic diversity of 90 wild trees of *D. stevensonii* from six populations located in its natural range was evaluated. Genetic diversity was moderate, with an average of 5.83 alleles per locus and a mean Shannon index value of 1.42, an observed heterozygosity of 0.32, and an expected heterozygosity of 0.37. The expected heterozygosity varied among populations, being the highest at 0.46 in Lachuá and the lowest at 0.25 in Cahabón. Analysis of molecular variance showed that only 6% of the genetic variation was between populations, and pairwise F_{st} values indicated moderate differentiation between populations. STRUCTURE analysis revealed the existence of three clusters for the 90 samples, and the six populations were separated into three distinct clusters. With MS medium supplemented with 4% sorbitol, 80% plant survival was obtained at 20 weeks. Conservation of the genetic diversity of *D. stevensonii* is critical to ensure its long-term survival and the success of breeding programs. These findings provide a crucial genetic basis for this endemic species' conservation, management, and restoration.

Keywords: *Dalbergia stevensonii*, population structure, genetic diversity, microsatellites, core collection.

3 Introducción

Guatemala es reconocida como un país megadiverso debido a su alta diversidad biológica (Consejo Nacional de Áreas Protegidas [CONAP], 2013). Sin embargo, su biodiversidad se encuentra en riesgo debido a los altos índices de deforestación, la cual resulta en la pérdida anual de 48,084 hectáreas de bosques a 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). Estas actividades, en conjunto con la extracción ilegal de madera, tienen un impacto directo en la sobrevivencia de especies forestales nativas de alto valor comercial.

Dalbergia stevensonii Standl es una especie forestal de alta importancia económica debido a la excelente calidad de su madera. Sin embargo, según el inventario de abundancia de *D. stevensonii* (Fundación Natureleza para la Vida [FNPV], 2016), en el período 1991-2012 se dio una reducción del 30.86% de la cobertura de esta especie. Esto evidencia la fuerte presión a la que la especie está sometida por factores como deforestación, fragmentación de su hábitat y, sobre todo, la extracción ilegal de madera. Además, el incremento en la ganadería, agricultura, crecimiento de la población y sobre explotación son acciones que amenazan constantemente con la destrucción de su hábitat natural (FAUSAC-FNPV, 2015). Al ser considerada como una especie productora de madera preciosa, el valor comercial puede alcanzar los USD 4,300 por metro cúbico (Nhung et al., 2020; Zhu, 2020), razón por la cual la extracción ilegal se ha convertido en una fuerte amenaza para la sobrevivencia de las poblaciones naturales de *D. stevensoni*.

La sobre explotación selectiva a la que ha sido sometida la especie *D. stevensonii* ha impactado directamente en la reducción de sus poblaciones, convirtiéndola en una especie amenazada (Vardeman & Runk, 2020). La lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha colocado a *D. stevensonii* en la categoría de “*en peligro crítico*” (Barstow & Linares, 2020). La disminución del tamaño de las poblaciones de *D. stevensonii* tiene consecuencias negativas en la capacidad de adaptación, aptitud reproductiva y frecuencias genotípicas (Frankham, Ballou, & Briscoe, 2004; Loo, 2011), así como en los patrones de diversidad y estructura genética (Baucom, Estill, & Cruzan, 2005; Davies et al., 2013; Hanson, Brunfeldt, Finegan, & Waits, 2008). La disminución del tamaño poblacional aumenta el riesgo de cruzamiento endogámico, lo que a su vez reduce la heterocigosidad y la diversidad genética (Cordero et al., 2003; Frankham et al., 2004). Esto

es particularmente preocupante para la sobrevivencia de especies forestales nativas de alto valor comercial en Guatemala, dada la tasa de pérdida anual de bosques y la extracción ilegal de madera (CONAP, 2013; MARN, 2017; UVG et al., 2011).

Esta propuesta de investigación representa el primer esfuerzo para detallar el estado genético actual del germoplasma nativo *D. stevensonii* en sus áreas de dispersión natural, determinando el nivel de diversidad, erosión genética y estado de endogamia de las poblaciones a analizar. La información generada constituye un invaluable instrumento para dirigir futuras y urgentes acciones de conservación, restauración y mejoramiento (Gallo et al., 2009). La incorporación del componente genético es fundamental en este tipo de procesos, ya que disminuye el riesgo de endogamia y mejora la probabilidad de que los ecosistemas restaurados prosperen y puedan adaptarse a cambios ambientales (Thomas et al., 2014). Además, la caracterización molecular permite obtener datos cuantitativos con los cuales se podrá sustentar, objetivamente, la gestión de recursos para la protección de las áreas de dispersión natural de la especie.

Los objetivos contemplan describir la estructura genética de las poblaciones de *D. stevensonii*, determinar los niveles de riqueza y diversidad genética de las mismas y conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro. Para esto, se realizaron colectas en las zonas de distribución natural de la especie en la Franja Transversal del Norte y Petén (FNPV, 2016; Hernández-López, 2016; Ruíz-Mazariegos, 2017). El estudio de diversidad genética se llevó a cabo utilizando marcadores moleculares de tipo microsatélites a partir de los cuales se calcularon los índices de estructura poblacional y diversidad genética. Se llevó a cabo la creación de una colección núcleo in vitro para preservar el germoplasma nativo de *D. stevensonii*. En primer lugar, se recolectaron yemas axilares de los árboles que presentaban mayor diversidad genética. Luego, se realizó un ensayo para evaluar diferentes niveles de sorbitol en un medio MS basal para la conservación in vitro. Los resultados obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias, a fin de seleccionar la formulación con mejores resultados.

4 Planteamiento del problema

Guatemala es reconocida por ser un país megadiverso, destacando el hecho de poseer el 40% del total de especies endémicas de Mesoamérica (CONAP, 2013), entre las que se encuentra *Dalbergia stevensonii* Standl., una especie forestal de alto valor comercial por la excelente calidad de su madera. Sin embargo, el inventario de abundancia de *D. stevensonii* reporta una alarmante reducción (30.86%) de su cobertura en el período 1991-2012 (FNPV, 2016). Esto evidencia que la deforestación, fragmentación de su hábitat y, sobre todo, la extracción ilegal de madera somete a dicha especie a una fuerte presión. Además, el incremento en la ganadería, agricultura, crecimiento de la población y sobre explotación; son acciones que amenazan constantemente con la destrucción de su hábitat natural aumentando el riesgo de extinción (FAUSAC-FNPV, 2015).

Por ser especies productoras de madera preciosa, existe un gran interés por varias especies de *Dalbergia* en los mercados internacionales, existiendo un creciente tráfico ilegal, principalmente hacia China. Esto ha reducido drásticamente las poblaciones naturales a condiciones de extrema vulnerabilidad (Vardeman & Runk, 2020). Dadas las constantes amenazas a las que se encuentran expuestas las especies de *Dalbergia*, la UICN ha incluido en la lista roja a 83 de 304 especies del género (Barstow & Linares, 2020); mientras que CITES ha incluido en el apéndice II a todas las especies de *Dalbergia* presentes en Centro y Sudamérica, (UNEP-WCMC, 2015). Como efectos devastadores de la reducción poblacional, se presenta la deriva génica, así como 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, minimizando la diversidad genética (Cordero et al., 2003; Frankham et al., 2004). Esto conduce a la incapacidad de adaptación, disminución de la aptitud reproductiva y modificación negativa de las frecuencias genotípicas, comprometiendo seriamente la sobrevivencia de la especie (Frankham et al., 2004; Loo, 2011).

La determinación de la situación genética actual de las poblaciones naturales de *D. stevensonii*, es una herramienta indispensable e invaluable para planificar las urgentes acciones de conservación, restauración y aprovechamiento sostenible. El detalle de la situación genética actual incrementa la

probabilidad de que los ecosistemas restaurados puedan adaptarse a cambios ambientales, además de disminuir el riesgo de endogamia (Thomas et al., 2014). La conservación del germoplasma nativo de *Dalbergia stevensonii* a través de la conservación in vitro es fundamental para su protección y su uso en futuros programas de mejoramiento genético. Asimismo, esta técnica permite la propagación masiva de las especies, lo que posibilita su utilización en procesos de restauración de áreas naturales y en la creación de plantaciones comerciales con una alta calidad genética.

5 Delimitación en tiempo y espacio

- 5.1 Delimitación en tiempo: el proyecto fue ejecutado en un total de 11 meses, de febrero a diciembre del 2022. Posteriormente, se otorgó una prórroga hasta febrero del 2022, según el acuerdo el Acuerdo de Dirección DIGI P042-2022
- 5.2 Delimitación espacial: se muestrearon poblaciones en: Cobán, Fray Bartolomé de las Casas, Santa María Cahabón (Alta Verapaz) y una población en el departamento de Petén.

6 Marco teórico

6.1 Situación de los recursos forestales en Guatemala

Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO] (2015), cada año se degradan extensas zonas forestales en todo el mundo. Entre 2010-2015, hubo una pérdida neta de 6,6 millones de hectáreas anuales. En Guatemala, la cobertura forestal se estimó en 3,87 millones de hectáreas en 2006, disminuyendo a 3,72 millones de hectáreas en 2010. De la cobertura forestal de Guatemala en 2010, 1,94 millones de hectáreas se encontraban en áreas protegidas (INAB, et al., 2012). La tasa de deforestación estimada para 2006-2010 fue de 132.137 hectáreas anuales, con una disminución del 1,00% anual en el inventario forestal en los últimos cuatro años (Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente [IARNA], 2012). En 2010, el 51,9% de los bosques del país se encontraban dentro de áreas protegidas, mientras que el 48,1% restante estaba fuera de ellas.

6.2 Descripción de la especie *Dalbergia stevensonii* Standl.

Las especies de *Dalbergia*, un género de plantas perteneciente a la familia de las leguminosas, se conocen por nombres como Granadillo, cocobolo, Rosul o palo de rosa y están ampliamente distribuidas en los trópicos de todo el mundo, con cerca de 250 especies identificadas. Sin embargo, la mayoría de ellas se encuentran concentradas en África, Madagascar, sur de Asia, Centro y Sudamérica (Vatanparas et al., 2013). Cerca de 20 especies se comercializan por su fina madera, entre las que destacan el Rosul o corazón azul (*D. stevensonii* Standl.), el cocobolo (*D. Dalbergia retusa* Hemsl), el African blackwood (*D. melanoxylon*), la jacaranda de Brasil (*D. nigra*) y el sisu (*D. sissoo*). Muchas de ellas se encuentran en peligro de extinción debido a la sobreexplotación y para algunas otras hay regulaciones estrictas que buscan limitar su comercio internacional (Cervantes-Maldonado, 2016).

El rosul (*D. stevensonii*) es una especie maderable valiosa que se encuentra desde el suroeste de México, Guatemala, Belice y Honduras. Se caracteriza por poseer una madera muy fina, con diferencia de coloración entre la albura y el duramen. Se clasifica como excesiva a extremadamente pesada y muy resistente con propiedades insecticidas, alelopáticas y fungicidas (Cerdas & Guzmán, 2004). La madera de esta especie es considerada preciosa por lo que su valor monetario es muy alto, incluso mayor que el de otras especies como cedro y caoba. El valor comercial de la especie puede alcanzar los USD 3,500 dólares por metro cúbico (Nhung et al., 2020; Zhu, 2020). Las excelentes propiedades acústicas de la madera de *D. stevensonii* se deben a que produce madera dura de lento crecimiento, es por esto que existe una alta demanda mundial para la fabricación de guitarras, marimbas, xilófonos, clarinetes, flautas, mandolinas, y pianos y violines (Richter et al., 1996) .

6.3 Situación actual de *D. stevensonii* en Guatemala

Actualmente, las especies maderables de *Dalbergia* están siendo afectadas por la sobreexplotación y el tráfico ilegal, la deforestación y la fragmentación de sus hábitats. Además, la escasez natural de las especies, su lento crecimiento y bajo reclutamiento las hacen altamente vulnerables (Cervantes-Maldonado, 2016; Cervantes et al., 2019). En Guatemala, el hábitat típico se ha destruido y se encuentra bajo presión continua, particularmente por el incremento en la ganadería, agricultura,

plantaciones de palma de aceite, crecimiento de la población y sobre explotación y extracción ilegal (FAUSAC-FNPV, 2015)

En los últimos años ha surgido un gran interés por la madera de *Dalbergia* en los mercados internacionales y se ha detectado un creciente tráfico ilegal que está reduciendo drásticamente las poblaciones. De acuerdo con datos de CITES (2013) entre 2007 y 2012 China importó madera de *Dalbergia stevensonii* y otras *Dalbergias* proveniente de México por un total de 10,662 m³. La situación de comercio ilegal hacia China también ha ocurrido fuertemente en Centroamérica (Vardeman & Runk, 2020) impactando a las poblaciones de *D. stevensonii* y llevándolas a condiciones de extrema vulnerabilidad. La lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ha evaluado al género *Dalbergia* y ha clasificado a 83 de las 304 especies reconocidas de *Dalbergia*, colocando en el 2020 a la especie *D. stevensonii* en la categoría de “*en peligro crítico*” (Barstow & Linares, 2020).

La información presentada por FAUSAC-FNPV (2015), indica que la combinación de pérdida de cubierta forestal y la tala ha resultado en la disminución de las poblaciones de las especies del género *Dalbergia* en Guatemala. Dichas poblaciones silvestres de *Dalbergia* spp. (*D. retusa*, *D. tucurensis* y *D. stevensonii*, por ejemplo) han sido diezgadas como resultado de la tala intensiva y los efectos del cambio de uso de suelo durante el periodo 1991-2012. Según el inventario de abundancia de *D. stevensonii* (FNPV, 2016) en el mismo período de tiempo ha existido una reducción del 30.86% de la cobertura de esta especie, lo cual evidencia la presión a la que está sometida. La demanda de esta apreciada madera ejerce presión sobre las poblaciones existentes de *D. stevensonii*, llevando a la reducción de su densidad y tamaño poblacional, lo que constituye en conjunto una amenaza para la capacidad de regeneración de la especie.

6.4 Diversidad genética y su importancia en especies amenazadas

La diversidad genética se refiere a la variedad de alelos y genotipos presentes en una población o especie, lo que se manifiesta en diferentes características morfológicas y fisiológicas. La utilización de la diversidad genética en planes de manejo y restauración forestal mejora la adaptación de las plántulas y la sostenibilidad de las poblaciones. La endogamia y la deriva genética pueden aumentar el riesgo de erosión genética, especialmente en poblaciones pequeñas, lo que puede resultar en una

reducción de la diversidad genética en especies amenazadas o en peligro de extinción. Por lo tanto, se sugiere la selección de germoplasma con alta diversidad genética para fines de restauración forestal. La diversidad genética se mide a través de la riqueza alélica, la diversidad genética y la estructura genética poblacional, representada por el coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) (Ellstrand & Elam, 1993; Frankham et al., 2004; ; Thomas et al., 2014; Peakall & Smouse, 2015; Young et al., 1996; Wright, 1965).

6.5 Factores implicados en la diversidad genética

Los cambios evolutivos en las especies se deben a variaciones en las frecuencias alélicas que pueden ser afectadas por factores como las mutaciones, el flujo genético y la selección natural (Curtis et al., 2006). El estudio de la variación genética a nivel de poblaciones y especies, que se presenta por efecto de la deriva y el flujo genético, se puede comprender mediante marcadores moleculares del ADN. Las mutaciones son variantes en los alelos o cromosomas, que constituyen el origen de toda la diversidad genética, y pueden ser resultado de errores en el proceso de replicación del ADN o de elementos genéticos móviles, rupturas cromosómicas y otros (Frankham et al., 2004). El flujo genético, el movimiento de genes entre poblaciones, se ve afectado por la fragmentación y aislamiento de individuos o poblaciones (Nora et al., 2011).

6.6 Marcadores moleculares como herramienta para determinar la diversidad genética

Los marcadores genéticos se definen como secuencias de ADN con ubicación conocida en un cromosoma y asociadas a genes específicos o rasgos. Se pueden observar como variaciones en los loci debido a mutaciones o alteraciones genómicas y se utilizan para la detección de polimorfismos en el ADN. Los marcadores moleculares más comunes incluyen RFLP, RAPD, AFLP, ISSRs, SCARs, STSs, CAPS, SSRs, ESTs, SNPs y DArT. Su utilidad en el análisis genómico, filogenético, diversidad genética y localización de genes objetivo los hace más objetivos que la caracterización morfológica. Estos marcadores han sido continuamente mejorados desde su desarrollo original. (Al-Samarai & Al-Kazaz, 2015; Semagn, Bjørnstad, & Ndjiondjop, 2006; Jonah, Bello, Lucky, Midau, & Moruppa, 2011).

6.7 Marcador molecular de tipo Microsatélite (SSR)

Los microsatélites y minisatélites son tipos de repeticiones en tándem en el ADN que son genómicas y están involucradas en la evolución debido a su inestabilidad. Estos pueden mutar a tasas altas en cada generación celular (Gemayel et al., 2012). Los microsatélites se encuentran en procariontas y eucariotas, y están ampliamente distribuidos a lo largo del genoma, incluyendo regiones codificantes y no codificantes del ADN nuclear y de organelos (Pérez-Jiménez et al., 2013; Phumichai et al., 2015). Los marcadores SSR son adecuados para análisis de pedigrí, estructura de la población, variación del genoma, proceso evolutivo y las huellas genéticas (Abdul-Muneer, 2014). Aunque existen métodos moleculares más nuevos, como el genotipado por secuenciación o la secuenciación de ADN asociada a sitios de restricción, los SSR siguen siendo marcadores útiles y rentables (Hodel et al., 2016).

7 Estado del arte

7.1 Diversidad genética de *Dalbergia* spp.

Debido a la importancia de conocer la diversidad genética y estructura poblacional de las especies de *Dalbergia* con fines de conservación y aprovechamiento; se han desarrollado varios estudios alrededor del mundo empleando diversidad de marcadores moleculares, así como estudios de filogenia y filogeografía. Mediante el uso de marcadores dominantes ISSR se evaluó la diversidad genética de tres especies de maderas exóticas del género *Dalbergia* (*D. assamica*, *D. nigrescens* y *D. tonkinensis*) en Vietnam encontrando un alto valor de diversidad en las tres especies estudiadas así como una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas (Phong et al., 2011). Un estudio posterior en Vietnam se enfocó en *D. cochinchinensis* con los marcadores ISSR y RAPD llegando a determinar un alto valor de diversidad genética, así como la funcionalidad de ambos marcadores de forma individual o combinada (Vu Thi Thu Hien, 2012). Otro estudio en Pakistán con *D. sissoo* mediante el marcador ISSR, confirmó la existencia de un alto valor de diversidad genética, por lo cual se recomendó su aprovechamiento en programas de mejoramiento genético y programas de conservación (Javaid et al., 2014).

El uso de marcadores codominantes de tipo microsatélites fueron empleados para evaluar el efecto de la fragmentación de poblaciones naturales de *D. monticola* en la diversidad genética, encontrando relación entre la fragmentación de hábitat y la pérdida de diversidad genética (Andrianoelina et al., 2009). Un estudio más reciente basado en doce marcadores microsatelites para determinar la estructura genética de *D. cochinchinesis* y *D. oliveri* en Indochina logró establecer que los principales cuerpos de agua de la región muestreada representan barreras que limitan el flujo genético entre las poblaciones, por lo cual, el mayor efecto de diversidad genética se presente dentro de las poblaciones (Hartvig et al., 2018). De forma más reciente, evaluó la diversidad genética y estructura poblacional de *D. odorifera* para desarrollar una colección núcleo de conservación de germoplasma, encontrando diferenciación entre las poblaciones y tomando seis árboles silvestres y 25 cultivados para la conservación núcleo (Liu et al., 2019). Otras evaluaciones han estudiado la potencial transferencia de marcadores microsatélites entre diversas especies de *Dalbergia* por la importancia de estos marcadores en el estudio de estructura poblacional y diversidad genética (Buzatti et al., 2016).

El uso de otras técnicas como el Barcoding por ADN ha significado un gran avance para la identificación de especies de *Dalbergia* con fines de conservación (Hartvig et al., 2015). Además, debido a los avances en las nuevas tecnologías para secuenciación, se ha logrado obtener el genoma completo del cloroplasto de algunas especies de *Dalbergia* como *D. cochinchinensis*, con lo cual se han conseguido grandes avances en el establecimiento de la filogenia de estas especies (Song et al., 2019; Xu et al., 2019).

Actualmente, el uso de nuevas técnicas de genotipado, que se basan en el uso de endonucleasas de restricción y secuenciación de nueva generación, han revolucionado el estudio de diversidad genética y estructura poblacional, pudiendo ser aplicadas a todo tipo de organismos (Andrews et al., 2016; Vendrami et al., 2017). Principalmente, la técnica ddRAD-seq es reconocida por su potencial en estudios de diversidad genética y estructura de poblaciones (Basak et al., 2019; Yamashita et al., 2019).

8 Objetivos

General

1. Identificar la diversidad genética de *Dalbergia stevensonii* en las áreas de distribución natural en Guatemala en el departamento de Petén y la Franja Transversal del Norte con fines de conservación y mejoramiento.

Específicos

1. Describir la estructura genética de las poblaciones de *D. stevensonii* en las áreas de estudio.
2. Determinar los niveles de riqueza y diversidad genética para las poblaciones identificadas en las áreas de estudio.
3. Establecer una colección núcleo in vitro del germoplasma de *D. stevensonii* genéticamente más diverso.

9 Hipótesis

La reducción poblacional, producto de la sobreexplotación y extracción ilegal, en las áreas de distribución natural de *D. stevensonii* ha generado una estructura poblacional altamente definida, así como un desequilibrio en las proporciones genotípicas de equilibrio de Hardy-Weinberg a razón de una desproporción de heterocigotos.

10 Materiales y métodos

10.1 Enfoque de la investigación

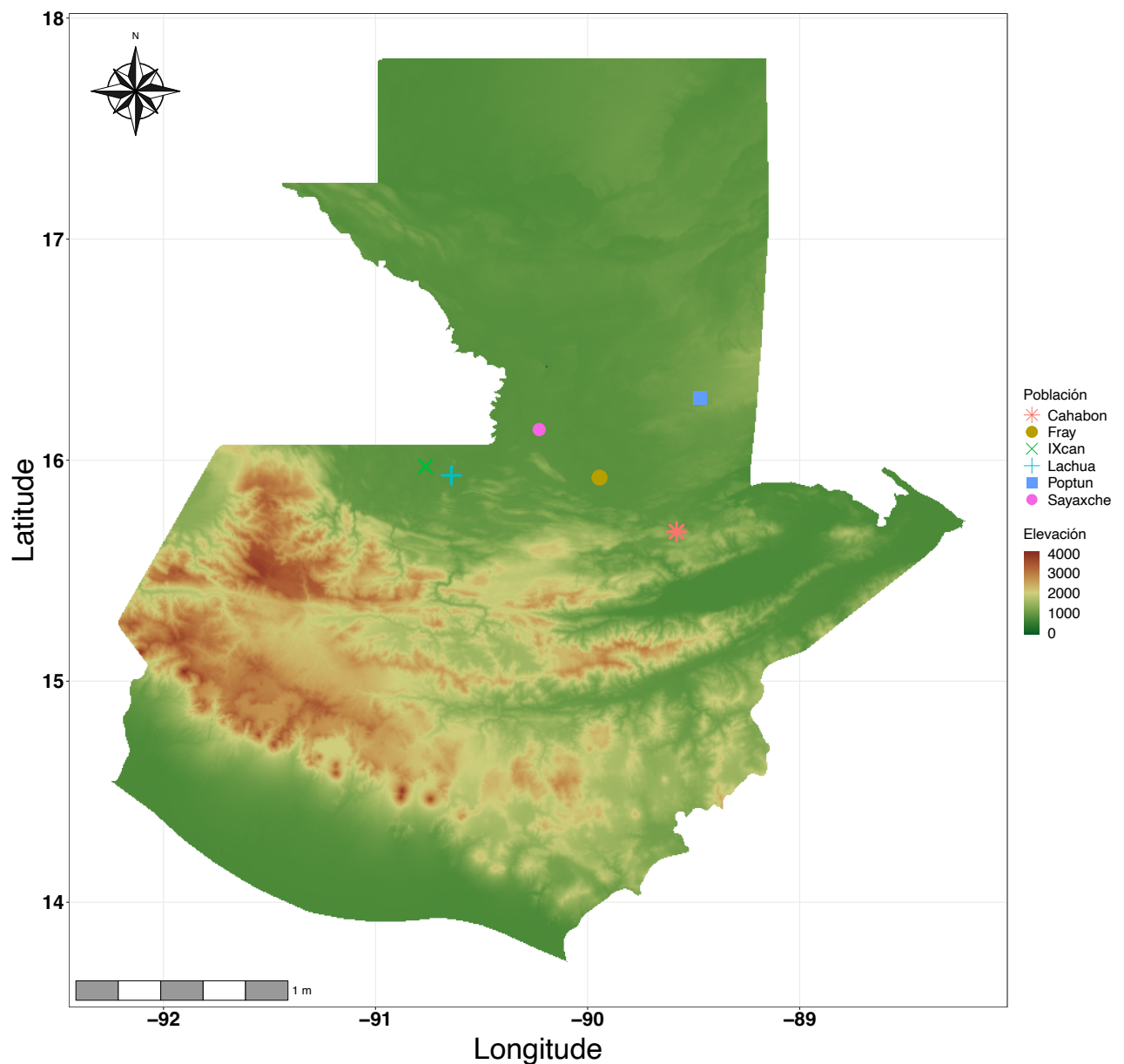
La investigación es cuantitativa ya que se determinaron los niveles de diversidad genética inter e intra poblacional de *Dalbergia stevensonii*.

10.2 Recolección de la información

Las áreas de colecta estuvieron basadas en los trabajos de Ruíz-Mazariegos (2017), Hernández-López (2016) y el Inventario de la población y abundancia de las especies de *Dalbergia retusa* y *D. stevensonii* en las áreas de ocurrencia natural de Guatemala (FNPV, 2016).

En el departamento de Petén, las colectas en poblaciones naturales se realizaron en los municipios de Sayaxché y Poptún. En la Franja Transversal del Norte, las colectas se realizaron en las poblaciones naturales ubicadas en los municipios de Ixcán, Cobán, Fray Bartolomé de las Casas y Santa María Cahabón.

Figura 1. Mapa de poblaciones muestreadas. Un total de 90 arboles de *D. stevensonii* fueron muestreados en seis poblaciones geográficas.



10.3 Técnicas e instrumentos

Extracción y purificación de ADN

El material vegetal congelado se pesó en un rango de 50 a 75 mg. Se colocó en un mortero y se agregó nitrógeno líquido para su maceración con un pistilo, garantizando así la ruptura de las células y la eliminación de metabolitos secundarios. Para extraer y purificar el ADN, se siguió el protocolo CTAB 2X descrito por Doyle, (1987) (CTAB 2%, NaCl 5M, Tris HCl 1M, EDTA 0.5M, 1% PVP, 0.2% β mercaptoetanol). La integridad del ADN se verificó mediante geles de agarosa-TAE y su concentración y calidad se midieron con un fluorómetro Quantus™. El ADN se guardó en un congelador a -20°C después de ser eluido en 100 μ L de tampón TE 1X.

Amplificación del ADN

Las amplificaciones por PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 20 μ L como sigue: 10 μ L de 2X Taq MasterMix (Promega), aproximadamente 50 ng de ADN, 5 pmol de cebador inverso y 5 pmol de cebador directo con el extremo 5' marcado con colorantes fluorescentes (FAM, PET, VIC o NED), y agua bidestilada estéril añadida a 20 μ L. Las reacciones de PCR se realizaron con un perfil de touchdown con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 min; 10 ciclos de 94 °C durante 30 s, 65 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, con una disminución de 1 °C en la temperatura de recocido de cada ciclo; 35 ciclos de 94 °C durante 30 s, 55 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s; y una extensión final a 72 °C durante 10 min (Tabla 1). Los productos de la PCR se detectaron mediante un analizador de electroforesis capilar ABI 3730XL con un estándar de tamaño GeneScan-500LIZ. Los fragmentos se genotipificaron para determinar su presencia/ausencia en cada locus, y los tamaños de los alelos se puntuaron utilizando GeneMaker v2.2.0 (SoftGenetics LIC, State College, PA, EE.UU.) y se comprobaron manualmente dos veces para reducir los errores de genotipificación.

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

Tabla 1. Características de los cebadores utilizados para el genotipado de *D. stevensonii*.

Nombre	Motif	Cebador delantero (5'...3')	Cebador reverso (5'...3')	Tm	SR
Dhup14	(TCT)5	TCACAAAGGTATGCATTGCC	TATACGCTTGGCATTGCGAG	59	207~219
Dhup61	(GGA)11	GGTCGAAGTGGGAATCGAAG	ATTCTCCCTCCCTTGCTCAT	60	102~120
Dhup64	(TTA)9	AGTTAGGTGCACCACAGCCT	TCTATGCCGATGTTCCCTC	59	158~188
Dhup70	(TTA)14	AAGCAACGGAACAATATGAAAAA	TTATTATCACCCACCGCACA	59	203~248
Dhup78	(ATT)10	AGTATCCATCCCTGGGTTCC	GTGGGTGGCGTACTGTTTT	59	257~284
Dhup89	(TA)20	TACCGTTGGATGTGATGGTG	ATGCTTCCTGCACCCTAGAA	59	143~177
Dhup90	(AAT)12	TCCGATATGCAAACATGAGC	AATCACGTGGCTTTGATTCC	59	222~255
Dhup194	(AAT)8	AACGATTGATCTCTTGGTCATGT	TGTCGGTGTCTATCAATTCCC	59	247~292
Dhup191	(AAT)8	GTGATGGTCACGTCATTTGC	TTTCTCACCGCGTAACTT	59	279~303
Dhup185	(AT)14	GTGCCAAGTACAACCTGCGAA	TCACACTTAGCCACCCTTATGA	59	258~308
Dhup183	(AT)14	GCAGACATGGTGGTTTCAGA	CGATATTATCACATTTAAAGACTTGG	58	272~324
Dhup181	(AT)14	CCACCAGCAAATAGCTCACA	GGATTCCGAACTTGAAGAA	59	271~293

Tm: temperatura de alineamiento; SR: rango de tamaño de alelos.

10.4 Procesamiento y análisis de la información

Diversidad genética

Se utilizó el programa GenoDive v.3.05 (Meirmans, 2020) para calcular estadísticos importantes como el número de alelos (N_a), número de alelos efectivos (N_e), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e), índice de fijación corregido ($G'ST(Nei)$) y coeficiente de endogamia (GIS) con el fin de evaluar la diversidad genética por locus y por población. Además, se utilizó FSTAT (Goudet, 1995) para calcular la riqueza alélica (A_r) a través de un método de rarefacción. El índice de información de Shannon (I) se llevó a cabo en GenA1EX v.6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Las pruebas de equilibrio Hardy-Weinberg y el análisis de la varianza molecular (AMOVA) se realizaron en GenoDive.

Estructura genética de las poblaciones

Se implementó un análisis de conglomerados jerárquico para explorar la estructura genética de las muestras de *D. stevensonii*. Se utilizó el paquete poppr para calcular la distancia genética de Nei, agrupamiento jerárquico UPGMA y transformación en un árbol de clase phylo (Paradis & Schliep, 2018). Luego, se visualizó con iTOL v4 (Letunic & Bork, 2019). Se aplicó tanto a nivel de poblaciones e individuos.

Para explorar la estructura de las poblaciones, se usó un método de agrupamiento bayesiano con el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Se ejecutó con 10,000 pasos y 100,000 iteraciones de MCMC para números de grupos de 1 a 10 (Hubisz et al., 2009). Los resultados fueron analizados con el paquete pophelper (Francis, 2017) y visualizados con gráficos de barras y torta. El valor óptimo de K se comparó con estimadores de Puechmaille (Puechmaille, 2016).

La asignación de la población de STRUCTURE se confirmó con un análisis DAPC (Jombart et al., 2010). Se utilizó el paquete adegenet y la función BIC para elegir el número óptimo de grupos genéticos (Jombart, 2008). Los grupos se visualizaron con un diagrama de dispersión y gráfico de barras. Se confirmó también con un DAPC utilizando información a priori y validación cruzada (Xval.dapc).

Diferenciación poblacional

La estructura genética de las poblaciones fue investigada a través del análisis de varianza molecular (AMOVA) implementado en el software poppr. Los componentes de covarianza se usaron para calcular los índices de fijación y determinar el flujo de genes y la diferenciación entre poblaciones (Grünwald & Hoheisel, 2006). La significancia se determinó mediante una prueba de aleatorización con 1,000 permutaciones. La cantidad de flujo de genes (N_m) entre las poblaciones se estimó a través de la fórmula $N_m = [(1/F_{st}) - 1]/4$. La prueba de Mantel se realizó en el software ade4 (Bougeard & Dray, 2018) sobre las matrices de distancias genéticas y geográficas con 10,000 permutaciones, para evaluar el aislamiento por distancia. La diferenciación de las poblaciones por pares se analizó usando el índice F_{ST} con 1,000 permutaciones en el paquete mmod (Winter, 2012).

11 Resultados

11.1 Polimorfismo de los marcadores microsatélites

Los 12 loci SSR presentaron un número de alelos por locus en un rango de 3.83 a 9.17. El mayor número de alelos (9.17) se detectó en el locus Dhup185, que también mostró el mayor número efectivo de alelos (N_e , 5.76), heterocigosidad esperada (H_e , 0.80) y diversidad de Shannon (I , 1.90) y contenido de información polimórfica (PIC, 0.60). En términos del PIC global, tanto Dhup185 como Dhup89 fueron altamente informativos con valores de PIC superiores a 0.60, mientras que Dhup14 y Dhup70 fueron menos informativos con valores de PIC inferiores a 0.25, y los 8 loci restantes fueron moderadamente informativos con valores de PIC entre 0.25 y 0.50. La media del índice de fijación de Wright (F) fue de 0.39, oscilando entre -0.11 (Dhup78) y 0.68 (Dhup191). A excepción de los Dhup61 y Dhup78, el resto de los loci mostraron desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en los 90 individuos de *D. stevensonii*.

Tabla 2. Estadísticas de diversidad de los 12 loci SSR en 90 muestras de *D. stevensonii*.

Locus	Na	Ne	I	Ho	He	PIC	Fis	F	Nm	P _{HWE}
Dhup14	4.00	3.23	1.23	0.33	0.69	0.24	0.50	0.49	1.70	0.005**
Dhup61	5.50	3.58	1.41	0.70	0.72	0.45	0.00	0.01	2.14	0.727ns
Dhup64	6.67	4.17	1.59	0.32	0.70	0.55	0.57	0.58	2.40	0.027*
Dhup70	3.83	1.77	0.79	0.13	0.45	0.23	0.67	0.71	4.47	0.000***
Dhup78	6.67	4.64	1.61	0.86	0.74	0.35	-0.10	-0.11	4.09	0.751ns
Dhup89	6.67	4.96	1.66	0.27	0.70	0.61	0.65	0.67	2.04	0.000***
Dhup90	5.83	3.65	1.47	0.58	0.76	0.54	0.18	0.14	2.23	0.021*
Dhup181	5.67	3.95	1.46	0.42	0.75	0.44	0.42	0.46	4.65	0.000***
Dhup183	5.67	2.56	1.16	0.40	0.53	0.34	0.24	0.24	1.56	0.000***
Dhup185	9.17	5.76	1.90	0.44	0.80	0.69	0.44	0.48	2.27	0.000***
Dhup191	5.33	3.41	1.38	0.24	0.69	0.32	0.65	0.68	4.69	0.000***
Dhup194	5.00	3.66	1.39	0.39	0.77	0.33	0.45	0.40	2.45	0.000***
Promedio	5.83	3.78	1.42	0.32	0.37	0.45	0.38	0.39	2.89	

Na – número de alelos observados; Ne – número de alelos efectivos; I – índice de Shannon, Ho – heterocigosidad observada; He – heterocigosidad esperada; Fis – índice de endogamia; Fst – índice de diferenciación genética; Nm – flujo genético estimado a partir de Fst $Nm = [(1/Fst) - 1]/4$; P_{HWE} – valor p para la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg; ns no significativo, * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

11.2 Diversidad genética en las poblaciones de *D. stevensonii*

Entre las seis poblaciones investigadas, el porcentaje de loci polimórficos varió (PPL) de 65.45% a 89.75% (Tabla 3). Presentando el mayor PPL, la población Lachua también tuvo el mayor número de alelos diferentes ($N_a = 7.25$), mientras que Cahabon, con el menor PPL, tuvo el menor N_a (4.50). En total, se identificaron siete alelos privados entre las poblaciones investigadas, de los cuales, tres se encontraron en Lachua, dos en Ixcan, y uno en Fray y Sayaxché, respectivamente. La heterocigosidad observada (H_o) osciló entre 0.22 (Cahabon) y 0.41 (Lachua) y la heterocigosidad esperada (H_e) entre 0.25 (Cahabon) y 0.46 (Lachua), con una media de 0.32 y 0.37, respectivamente. Además, la población Lachua, que posee el mayor nivel de diversidad genética (H_e , 0.46), también mostró el mayor valor de diversidad de Shannon (1.70).

Tabla 3. Resumen de los diferentes estadísticos de diversidad poblacional de *D. stevensonii* promediados sobre los 12 loci SSR.

Población	N	N_a	N_e	A_p	I	H_o	H_e	F	Fis	P_{HWE}	PPL
Ixcan	15.00	6.58	4.01	2	1.54	0.39	0.42	0.44	0.48	**	88.50
Lachua	15.00	7.25	5.08	3	1.70	0.41	0.46	0.50	0.39	**	89.75
Fray	15.00	5.50	3.14	1	1.22	0.40	0.39	0.34	0.37	**	80.55
Sayaxche	15.00	5.42	3.59	1	1.36	0.27	0.40	0.28	0.45	**	77.54
Poptun	15.00	5.75	3.76	0	1.41	0.24	0.29	0.40	0.35	**	77.54
Cahabon	15.00	4.50	3.10	0	1.30	0.22	0.25	0.39	0.24	**	65.45
Promedio		5.83	3.78	-	1.42	0.32	0.37	0.39	0.38		79.88

N_a – número de alelos diferentes; N_e – número de alelos efectivos; A_p - número de alelos privados; I – índice de Shannon, H_o – heterocigosidad observada; H_e – heterocigosidad esperada; F – índice de fijación; Fis – índice de endogamia; P_{HWE} – valor p para la desviación del equilibrio Hardy-Weinberg: ns no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. PPL - porcentaje de loci polimórficos.

Se realizaron análisis AMOVA y F_{st} por pares para investigar las variaciones genéticas entre las poblaciones. El análisis AMOVA se realizó sin agrupar las poblaciones investigadas. El resultado mostró que sólo el 6% de la variación genética total se producía entre poblaciones, y que el 39% de la

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

variación intrapoblacional se debía a la heterocigosidad de los individuos dentro de cada población (Tabla 4). El F_{st} global fue muy pequeño (0.06, Tabla 4), el flujo genético global fue de 2,89 (Nm) estimado entre todas estas poblaciones (Tabla 2). Además, el F_{st} por pares osciló entre 0.013 y 0,107 (Tabla 5). El nivel más alto se dio entre las poblaciones Lachua y Fray (0,107), mientras que el más bajo se dio entre Poptún y Cahabón (0.013).

Tabla 4. Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para seis poblaciones de *D. stevensonii*.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	F_{st}	Fis
Entre poblaciones	5	74.139	14.828	0.290	6%		
Dentro de poblaciones	84	514.233	6.122	1.789	39%		
Entre individuos	90	229.000	2.544	2.544	55%		
Total	179	817.37		4.62	100%	0.063	0.413

Tabla 5. Índice de diferenciación genética por pares (F_{st}) entre las seis poblaciones. Valores por debajo de la diagonal

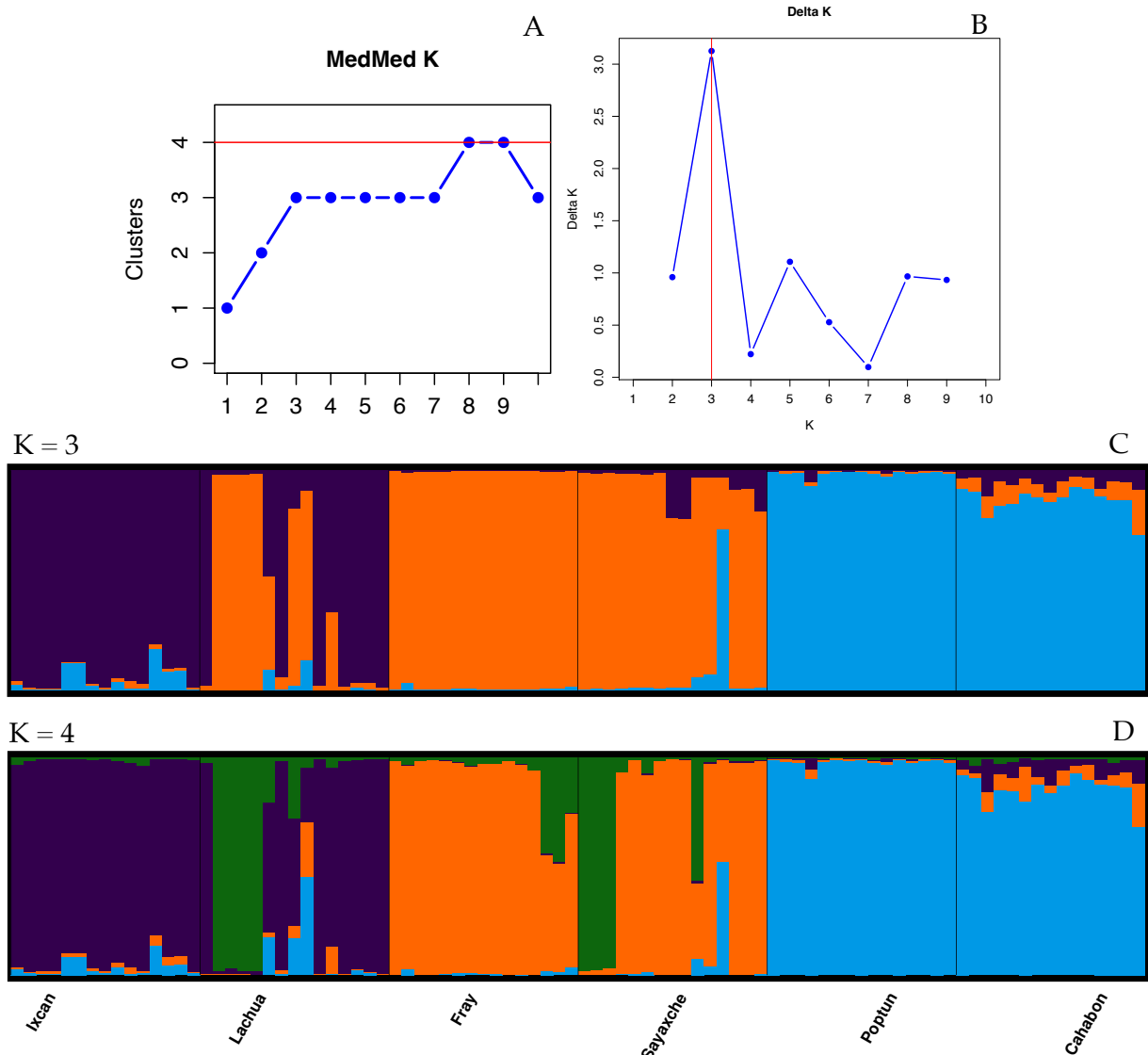
Población	Ixcán	Lachua	Fray	Sayaxche	Poptun	Cahabon
Ixcán	0.000	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*
Lachua	0.048	0.000	0.001*	0.001*	0.001*	0.001*
Fray	0.108	0.107	0.000*	0.005*	0.001*	0.001*
Sayaxche	0.051	0.061	0.037	0.000	0.001*	0.002*
Poptun	0.082	0.093	0.094	0.070	0.000	0.033*
Cahabon	0.031	0.056	0.052	0.035	0.013	0.000

Los valores por debajo de la diagonal indican la magnitud de diferenciación (F_{st}); los valores por encima de la diagonal indican el valor de probabilidad. * Significancia con valor de $p < .05$

11.3 Estructura poblacional de *D. stevensonii*

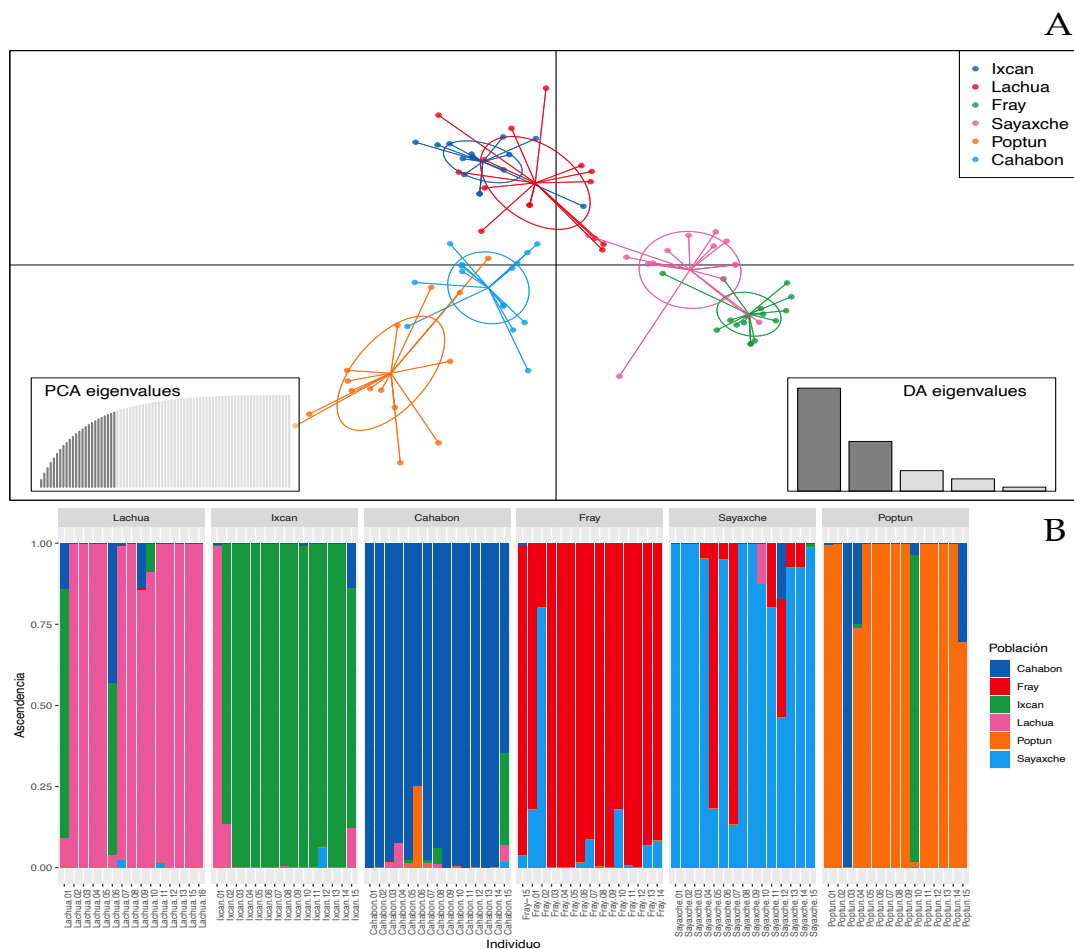
Se aplicó un enfoque basado en un modelo de mezcla para evaluar la estructura de la población de los 90 individuos de *D. stevensonii*. El número óptimo de conglomerados (K) de las poblaciones investigadas fue dos, con los mayores valores de delta K (3.13) recogidos del sitio web STRUCTURE SELECTOR (Figura 2a,b). Basándose en $K = 3$, en la Figura 2B se expuso una representación gráfica de los coeficientes de pertenencia estimados de cada individuo. Cada color mostró la proporción de pertenencia de cada individuo, representado por una línea vertical, a los tres conglomerados. El individuo con una probabilidad superior a 0.75 se consideró puro, y el que tuvo una probabilidad inferior a 0.75, de mezcla. En este análisis para $k = 3$, el conglomerado morado predominó en Ixcán incluía 17 individuos con 14 puros y 3 con mezcla, mientras que el conglomerado naranja incluyó la mayoría de individuos de Fray y Sayaxché. Asimismo, Poptún y Cahabón estuvieron formadas en su totalidad por individuos del clúster azul, mientras que Lachuá presentó mezcla del conglomerado morado y naranja.

Figura 2. Resultados del análisis STRUCTURE para 90 individuos de *D. stevensonii* basados en datos de 12 microsátelites. Estimación del número de conglomerados (K) utilizando los métodos (A) MedMed K y (B) Delta K. Estructura genética estimada de las seis poblaciones basada en el análisis STRUCTURE con un número de conglomerados (K) de tres (C) y cuatro (D). En cada gráfico, cada color representa un conglomerado diferente y los segmentos negros separan las poblaciones.



El análisis discriminante de componentes principales (DAPC) identificó una estructura similar, al utilizar información *a priori* del muestreo, indicando la formación de 3 conglomerados (I: Ixcan-Lachúa; II: Fray-Sayaxché; III: Poptún-Cahabón)

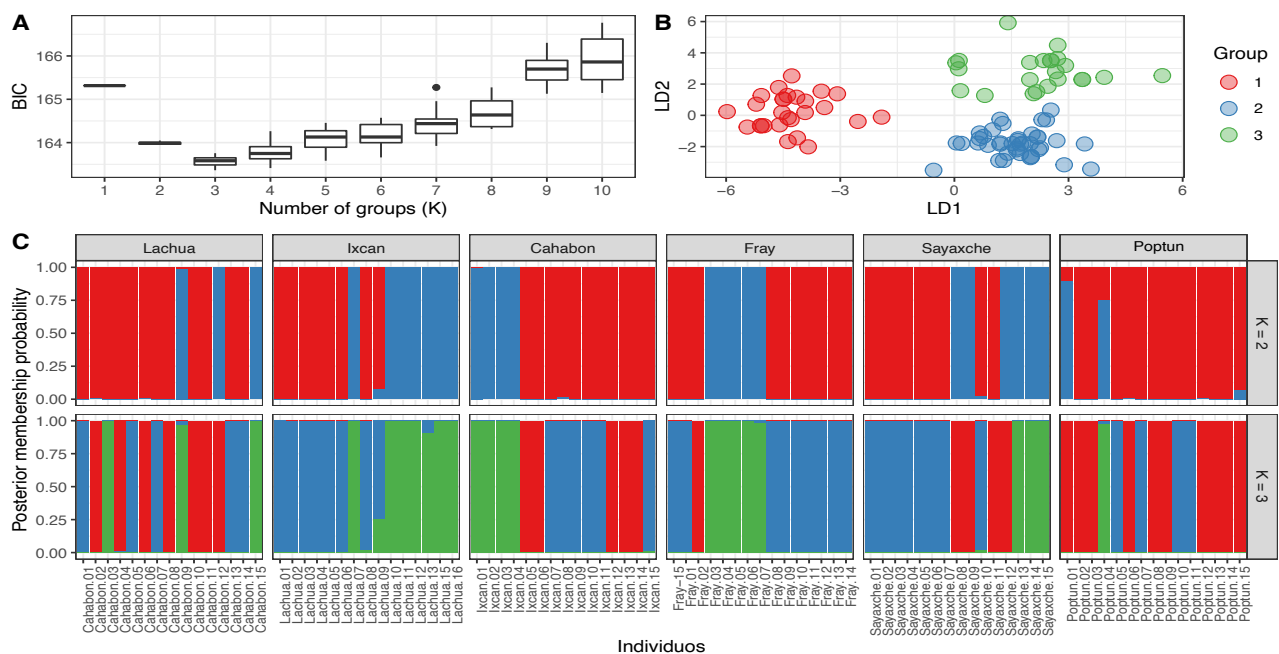
Figura 3. Estructura genética poblacional de 90 individuos de *D. stevensonii* de seis poblaciones silvestres utilizando análisis DAPC. En la figura A, se muestra un diagrama de dispersión de las dos primeras funciones discriminantes. La figura B muestra un gráfico de barras del análisis DAPC en el que cada individuo está representado por una línea vertical de color, y el mismo color indica que pertenecen al mismo grupo.



Los resultados del análisis DAPC (Figura 3) coincidieron con la asignación poblacional de STRUCTURE, sin usar información previa de muestreo. Para describir los datos, se retuvieron 35 componentes principales que representan el 77,6% de la varianza total, y se obtuvieron 2 funciones discriminantes. La función `find.cluster` detectó tres grupos con el valor más bajo del criterio de información bayesiano (BIC) (Figura 4A), que se confirmaron mediante un análisis de validación cruzada. El DAPC (Figura 4B) mostró tres grupos, siendo el conglomerado 2 el más grande con 40

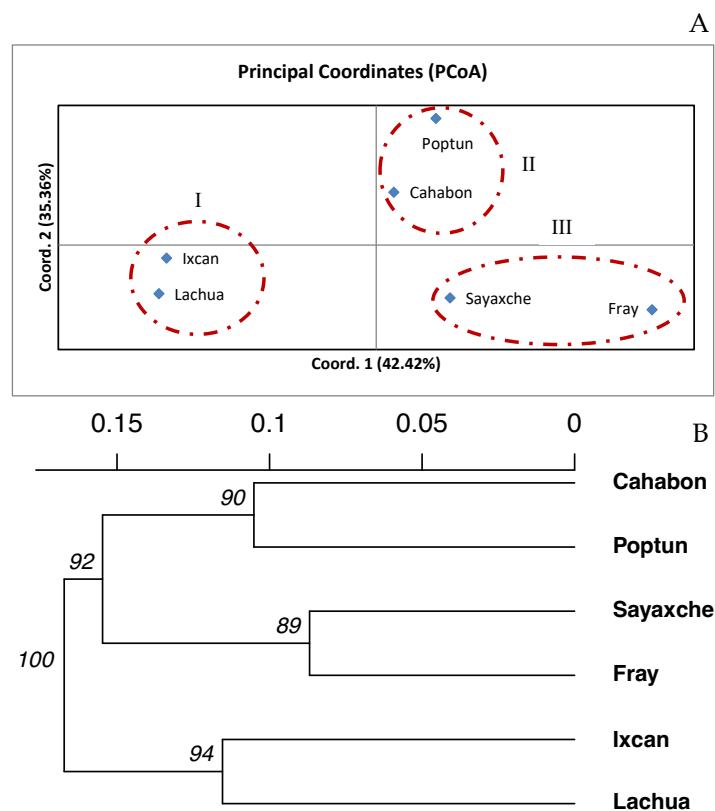
individuos, seguido del conglomerado 1 con 27 individuos y el conglomerado 3 con 23 individuos. El discriminante lineal 1 separó los grupos 1 (a la izquierda) del grupo 2 y 3 (a la derecha), mientras que el discriminante lineal 2 solo separó el grupo 1 del 2. Sin embargo, al asignar ascendencia para $K = 3$, no se observó una clara separación de las poblaciones (Figura 4C).

Figura 4. A) BIC para inferir el número más probable de grupos genéticos ($K = 3$). B) Diagrama de dispersión DAPC de los 90 individuos de *D. stevensonii* agrupados en 3 grupos genéticos. C) Representación de diagrama de barras de los resultados de DAPC. Las probabilidades de asignación a cada grupo genético se presentan con diferentes colores que representan los grupos genético. Se muestran las probabilidades de asignación a $K = 2$ y $K = 3$



La matriz F_{ST} por pares se utilizó para el análisis de coordenadas principales (PCoA). El primer y el segundo eje explicaron el 42.42% y el 35.36% de la varianza de los datos moleculares, respectivamente (Figura 3a). El análisis PCoA distinguió claramente tres grupos: Las poblaciones de Ixcán y Lachúa se agruparon como clúster I, Sayaxché y Fray se agruparon como clúster II y las otras dos poblaciones (Poptún y Cahabón) se agruparon como clúster III. Además, el árbol de dendrograma NJ (Neighbor-joining) mostró resultados similares basados en la distancia genética insesgada de Nei entre las poblaciones investigadas (Figura 3b).

Figura 5. Relaciones entre las seis poblaciones silvestres de *D. stevensonii* en Guatemala. (a) Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en la comparación por pares FST. La primera coordenada principal, explicó el 42.42% de la variación. La segunda coordenada principal, explicó el 35.36% de la variación. (b) Árbol UPGMA basado en la distancia genética de Nei entre seis poblaciones de *D. stevensonii*. Los valores en los nodos representan el soporte estadístico bootstrap de 1,000 iteraciones.

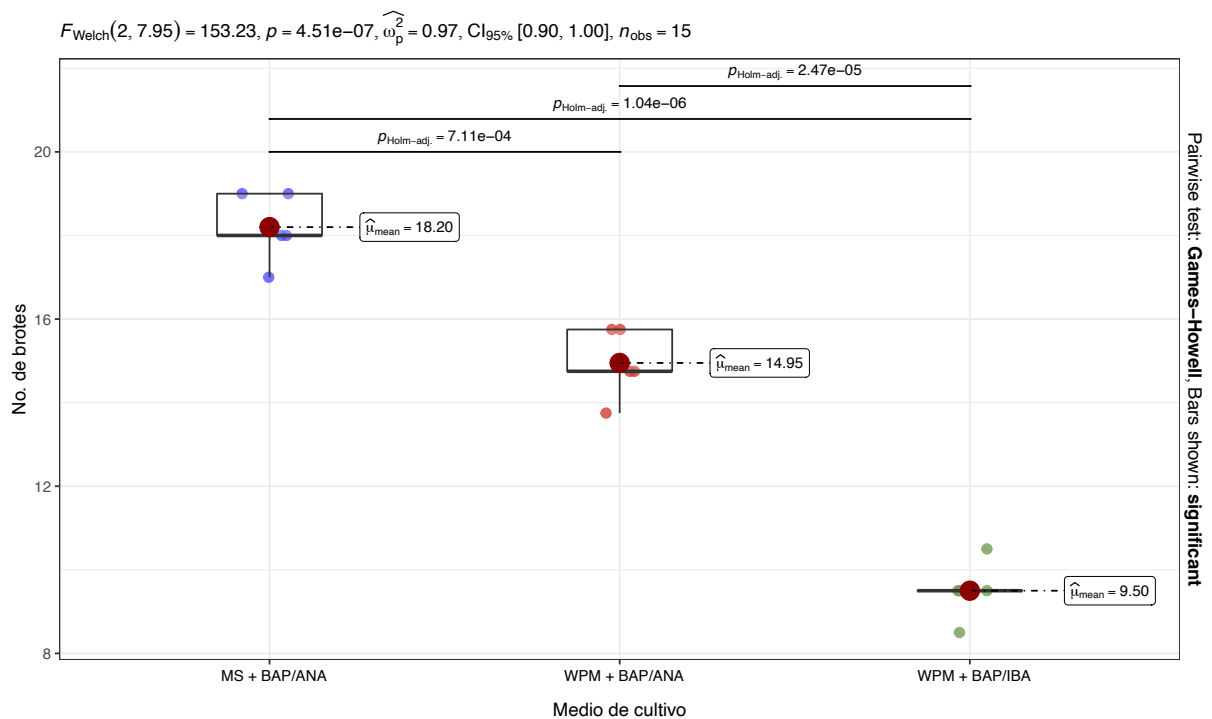


Posteriormente, se realizaron pruebas de Mantel entre las matrices de Fst por pares y la distancia geográfica y la distancia genética, respectivamente. Los resultados mostraron que las diferenciaciones genéticas entre las poblaciones investigadas se atribuían más a la distancia genética (R_{xy} : 89.3%, $p < 0.05$) que a la distancia geográfica (R_{xy} : 15.1%, $p < 0.05$). Por lo tanto, no hubo una estructuración clara basada en el origen geográfico ni un aislamiento predominante por distancia entre las poblaciones investigadas.

11.4 Conservar el germoplasma genéticamente más diverso bajo condiciones in vitro

Se llevaron a cabo experimentos para estimular el crecimiento de brotes a partir de explantes de *D. stevensonii*. Los resultados indicaron que los medios de cultivo MS mejorado con 2 y 3 mg L⁻¹ de BAP y ANA, WPM con la adición de 2.5 y 3.5 mg L⁻¹ de BAP y ANA, y WPM mejorado con 2.5 y 1 mg L⁻¹ de BAP e IBA mostraron una diferencia significativa ($p < 0.001$) con un tamaño de efecto alto ($\eta^2p = 0.97$). Los medios de cultivo MS mejorado y WPM fortificado con BAP y ANA resultaron ser más efectivos que la fortificación con BAP e IBA en el medio WPM. Los detalles se presentan en la Figura 6.

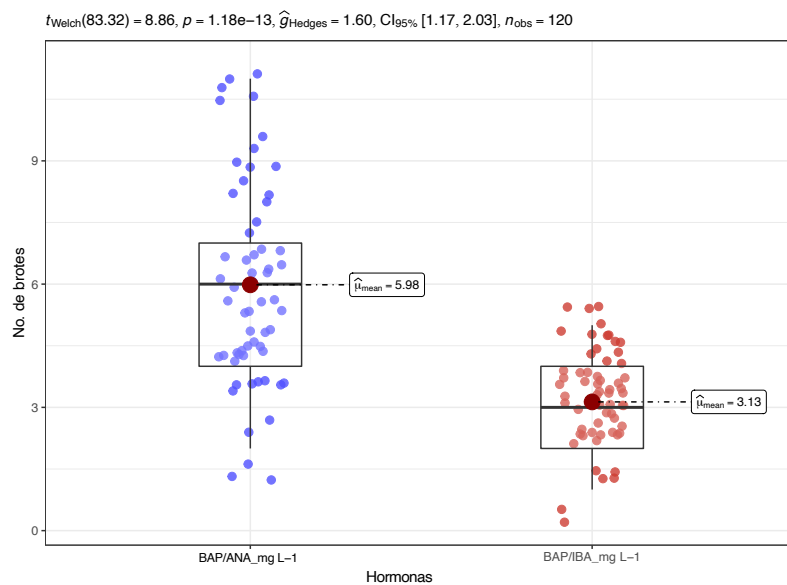
Figura 6. Comparación del número de brotes de *D. stevensonii* en medios de cultivo MS y WPM.



En cuanto a la evaluación de diferentes combinaciones hormonales, los resultados mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) y una gran diferencia entre los tratamientos

(dcohen = 1.05). Esto indica que en general, la combinación BAP/ANA produjo mejores resultados en comparación con la combinación BAP/IBA en el desarrollo de brotes (ver Figura 7).

Figura 7. Comparación del efecto de diferentes combinaciones de hormonas en el número de brotes de plantas in vitro de *D. stevensonii* establecidas sobre medio WPM: Resultados del análisis de varianza.

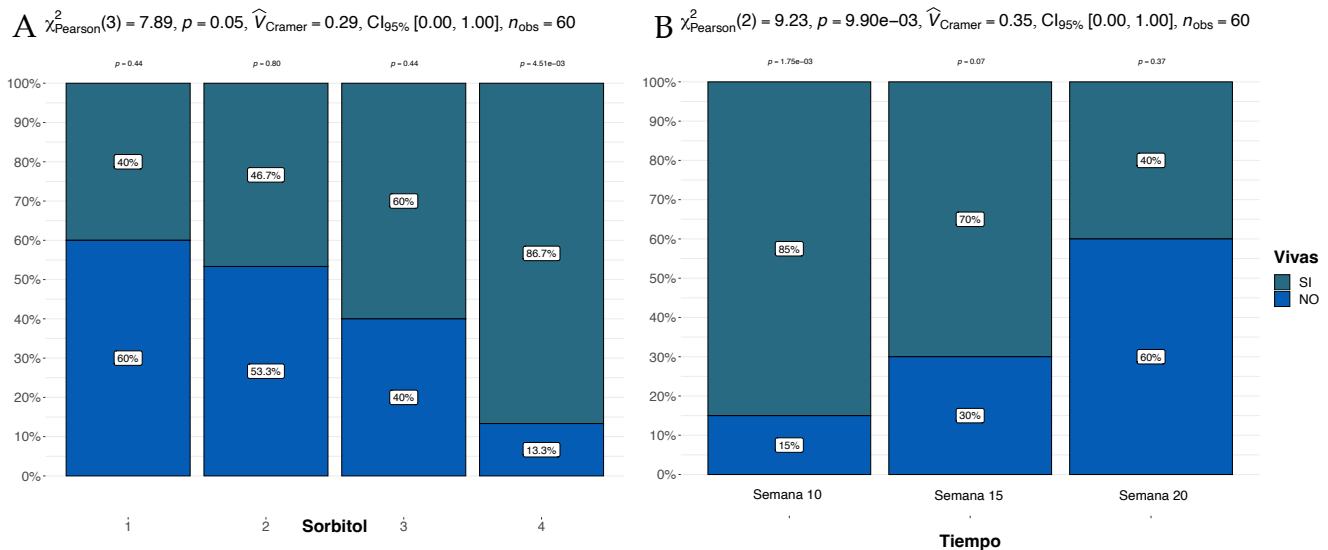


Durante la investigación sobre los métodos para la conservación de plantas in vitro a largo plazo, se encontró una diferencia significativa en los niveles de sorbitol a través de una prueba de asociación de variables de Chi cuadrado ($p=0.05$) con un tamaño de efecto moderado ($V_{cramer}=0.29$). Se examinaron cuatro concentraciones de sorbitol (1%, 2%, 3%, y 4% sobre el medio MS basal) y se encontró que la concentración más alta (4%) resultó en los valores más altos de sobrevivencia (86.7%), mientras que la concentración más baja (1%) obtuvo los valores más bajos (40%) (Figura 8A). Estos resultados sugieren que los niveles de sorbitol tienen un impacto significativo en la sobrevivencia de las plantas in vitro a largo plazo.

Se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.001$) en la tasa de supervivencia de las plantas a lo largo del tiempo, siendo la semana 10 el periodo con mayor cantidad de plantas vivas (85%) en comparación con la semana 20 (40%) (Figura 8B). Esto sugiere que la supervivencia de las

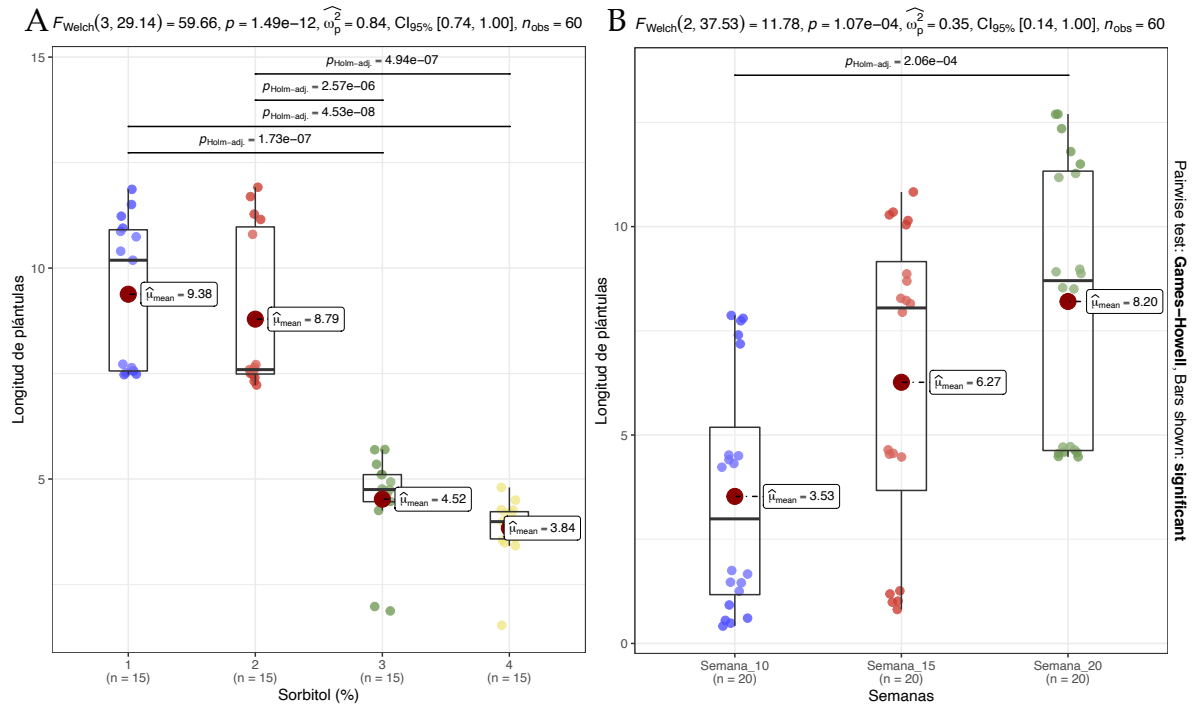
plantas disminuye a medida que son mantenidas en condiciones in vitro por más tiempo. No obstante, análisis posteriores indicaron que los niveles de sorbitol tienen un impacto significativo en la supervivencia a largo plazo.

Figura 8. Prueba de Chi cuadrado de A) diferentes porcentajes de sorbitol en medio de cultivo MS basal y B) efecto del tiempo sobre la sobrevivencia de plantas de *D. stevensonii* para su conservación in vitro.



Se encontró una diferencia altamente significativa ($p < .001$) en la longitud de las plantas conservadas in vitro en relación a las diferentes concentraciones de sorbitol, con un tamaño de efecto alto ($\eta^2p = 0.84$). Las concentraciones más altas y más bajas de sorbitol, 4% y 1% respectivamente, produjeron la menor y mayor longitud de las plantas, como se muestra en la Figura 9A. También se observó una diferencia significativa ($p < 0.001$) en la longitud de las plantas a lo largo del tiempo, con la semana 10 mostrando la longitud más corta con una media de 3.53 cm y la semana 20 mostrando la longitud más larga con una media de 8.20 cm, como se muestra en la Figura 9B.

Figura 9. Variación en la longitud de plantas in vitro de *D. stevensonii* por efecto de A) % de sorbitol y B) tiempo en semanas.



12 Discusión

12.1 Diversidad genética de *D. stevensonii*

La conservación de la diversidad genética es crucial para el éxito a largo plazo de las especies y desempeña un papel importante en los programas de mejoramiento genético. Sin embargo, los conocimientos sobre la diversidad genética de *D. stevensonii* son limitados, ya que a la fecha no existe ningún estudio que aplique marcadores morfológicos ni moleculares para estimar la variabilidad de la poblaciones.

La diversidad del material genético se relaciona con frecuencia con diversos factores, como el área de distribución geográfica, el tamaño de la población, la longevidad, el sistema de apareamiento, la migración y el equilibrio de la selección en las especies de plantas silvestres (Ferrer et al., 2004; Li et al., 2018). Un mayor nivel de diversidad genética se considera a menudo una indicación de una mejor adaptación al entorno de la especie (Gadissa et al., 2018). Sin embargo, se determinó que la diversidad genética de *D. stevensonii* fue de nivel medio a través de los valores de heterocigosidad observada y esperada de 0,32 y 0,37, respectivamente. Estudios previos han demostrado de forma consistente que las especies con distribuciones limitadas o endémicas suelen poseer una diversidad genética significativamente menor en comparación con aquellas con distribuciones más extendidas (Gichira et al., 2017; Hamrick et al., 1992; Zhong et al., 2019).

Esto es particularmente evidente en el caso de *D. stevensonii*, que es nativa de pequeñas regiones de Guatemala, y sus valores de diversidad genética son menores que los de especies arbóreas tropicales como *Olea europaea* Linn (12 marcadores SSR, $H_o = 0.75$, $H_e = 0,6$) (Dervishi et al., 2018), *Prunus africana* (Hook.f.) Kalkman (6 marcadores SSR, $H_o = 0,68$, $H_e = 0,73$) (Mihretie et al., 2015), y *Eugenia dysenterica* DC. (9 marcadores SSR, $H_o = 0,545$, $H_e = 0,62$) (Boaventura-Novaes et al., 2018). Curiosamente, la diversidad genética de *D. stevensonii* es incluso menor que la de algunas especies arbóreas raras y endémicas como *Boswellia papyrifera* (Del. ex Caill.) Hochst ($H_e = 0,69$) (Addisalem et al., 2016), *D. cochinchinensis* ($H_e = 0,55$) y *D. oliveri* ($H_e = 0,75$) (Hartvig et al., 2018). Se observaron resultados similares para *Ottelia acuminata* ($H_e = 0,35$, endémica del suroeste de China) (Zhai et al., 2018) y *Dipterocarpus alatus* Roxb. ex G.Don ($H_e = 0,22$, endémica del sureste

de Vietnam) (Vu et al., 2019), todo ello debido a la gran reducción del tamaño de la población como consecuencia de las actividades humanas. Como consecuencia de la tala extensiva de su valioso duramen, la distribución de las poblaciones de *D. stevensonii* en Guatemala ha disminuido considerablemente en las últimas décadas

En la actualidad, estas poblaciones están muy fragmentadas, cada subpoblación está formada por unos pocos individuos y rara vez se ven árboles de gran tamaño. Esto concuerda con la idea de que las especies con distribuciones restringidas tienden a tener una menor diversidad genética, principalmente debido a la sobreexplotación de sus recursos.

12.2 Diferenciación genética y estructura de poblacional

Las especies con un sistema de apareamiento cruzado tienden a tener una baja diferenciación entre poblaciones y una alta variación dentro de las poblaciones (Hartvig et al., 2018; Li et al., 2018). El análisis AMOVA de *D. stevensonii* mostró que la mayor parte de la variación genética se presenta dentro de las poblaciones (94%), mientras que sólo el 6% se daba entre poblaciones, lo que es menor que en otras especies de *Dalbergia* (0,236 en *D. cochinchinensis*; 0,126 en *D. oliveri*) (Hartvig et al., 2018). La diferenciación genética entre poblaciones se ve afectada por el flujo genético (Nm) y la deriva genética (Schaal et al., 1998).

Los 12 marcadores SSR del presente estudio, indican un flujo genético global de 2.89 (Tabla 2). Este flujo genético relativamente alto puede reducir los efectos de la deriva genética, disminuyendo la variación genética entre poblaciones y aumentando la diversidad dentro de las mismas. Sin embargo, la fragmentación de las poblaciones de *D. stevensonii*, a pesar del elevado flujo genético, puede deberse a acciones humanas, principalmente la sobreexplotación y la tala ilegal. Esta observación también se ha presentado en otras especies, como *Acer miaotaiense* (Li et al., 2018) y *Plectranthus edulis* Agnew (Gadissa et al., 2018). A pesar del elevado flujo genético, no se puede descartar la deriva genética, ya que el tamaño de las poblaciones es tan pequeño que cualquier reducción puede dar lugar a una deriva genética.

El F_{st} por pares sugiere que se encontró una diferenciación genética moderada entre las poblaciones silvestres de *D. stevensonii*, basada en un rango de 0,013 a 0,107 (Tabla 5). El mayor nivel de

diferenciación (0,107) se observó entre las poblaciones Lachuá y Fray, que están separadas por 100 km, lo que concuerda con la idea de que el aislamiento a largo plazo puede limitar el flujo genético entre poblaciones (Li et al., 2018). Sin embargo, el nivel de diferenciación entre Poptún y Cahabón fue sólo de 0,013, a pesar de estar separadas por 90 km. El análisis del modelo de STRUCTURE y los análisis de DAPC, UPGMA y PCoA sugirieron que los 90 árboles de *D. stevensonii* podían dividirse en tres clusters: El grupo I estaba formado por poblaciones Ixcán y Lachuá; el grupo II conformado por Poptún y Cahabón, mientras que el grupo III estaba formado por poblaciones de Sayaxché y Fray. La diferenciación genética entre las poblaciones fue positivamente relacionada tanto con la distancia geográfica (15.1%) como con la distancia genética (89.3%), según determinaron las pruebas de Mantel, siendo la distancia genética más influyente que la geográfica. No se encontró ninguna estructura de base geográfica clara ni signos de aislamiento por distancia, y se cree que la estructura actual de la población de *D. stevensonii* está más influida por las actividades humanas.

12.3 Conservación

El objetivo de los esfuerzos de conservación es desarrollar un plan para preservar la diversidad genética existente y garantizar la supervivencia de una especie en peligro a largo plazo (Forest et al., 2007). Actualmente, *D. stevensonii* tiene un nivel moderado de diversidad genética, un grado modesto de deficiencia de heterocigosidad, una diferenciación genética baja y un tamaño de población pequeño. Esta situación se debe en gran medida a las excesivas actividades humanas, sobre todo a la tala excesiva. El gobierno guatemalteco ha tomado varias medidas para abordar este problema, entre ellas la promoción de *D. stevensonii* a la lista de especies amenazadas por el Consejo Nacional de Áreas Protegidas y la prohibición de su explotación, así como el reservas nacionales para la conservación in situ, como la reserva nacional de la Laguna de Lachuá. A pesar de estos esfuerzos, el tamaño de la población de *D. stevensonii* sigue disminuyendo debido a la tala ilegal. Para evitar la pérdida de diversidad genética y aumentar la variabilidad genética mediante cruces, se considera que la mejor solución son las estrategias de conservación ex situ que tengan un impacto significativo.

12.4 Establecimiento in vitro

En cuanto a las condiciones de propagación in vitro, la concentración óptima de BAP para la inducción de brotes (2,5 mgL⁻¹) cae dentro del rango reportado para otras especies del género *Dalbergia* (Kiondo, Feyissa, Ndakidemi, & Seth, 2014; Manikandan, Bhuvanewari, Ramya, & Ramasubbu, 2017). Para el uso de ANA, se encontró que una dosis de 2,5 y 3 es similar a la reportada para el establecimiento in vitro de *Dalbergia retusa* en otros estudios (Valverde Cerdas & Alvarado Guzmán, 2004). Dosis de 0.5 y 1.0 mgL⁻¹ de IBA han sido reportadas exitosas para especies de *Dalbergia* (Aamir Ali, 2012), y una dosis de 1.0 mgL⁻¹ fue identificada como óptima para el establecimiento de *D. melanoxylom* (Kiondo et al., 2014). Sin embargo, los resultados muestran una mayor eficacia cuando se utiliza ANA en combinación con BAP.

En cuanto al uso de sorbitol para la conservación in vitro a largo plazo, una concentración del 4% es coherente con los informes para otras especies, tanto latifoliadas como herbáceas (Ciobanu & Constantinovici, 2013; Skalova et al., 2013). No obstante, en otros informes se han mencionado concentraciones inferiores, como el 2 % (El-Bahr et al., 2016), pero con un periodo de evaluación limitado a 10 semanas. En cambio, este estudio amplió el periodo de evaluación hasta 20 semanas. La longitud de las plantas in vitro expuestas a sorbitol muestra una disminución del crecimiento proporcional a la concentración utilizada (Millán-Orozco et al., 2011). Para la conservación in vitro del germoplasma nativo de *D. stevensonii* en Guatemala se recomienda un medio MS basal suplementado con 4% de sorbitol, que asegure al menos 80% de supervivencia de las plantas durante 20 semanas. Después de ese período, es recomendable trasplantar a un nuevo medio con las mismas características para continuar con el proceso de conservación.

13 Conclusiones

Se ha demostrado que la diversidad genética de *D. stevensonii* es de nivel medio, con valores de heterocigosidad observada y esperada de 0,32 y 0,37 respectivamente. Aunque estos valores son menores que los de otras especies arbóreas tropicales y endémicas, la diversidad genética de *D. stevensonii* es incluso menor que la de algunas especies endémicas de árboles raros. La fragmentación y disminución de las poblaciones de *D. stevensonii* debido a la tala extensiva, ha llevado a una disminución en la diversidad genética, lo que aumenta la importancia de la conservación y protección de estas poblaciones en el futuro.

Se identificó que las poblaciones de *D. stevensonii* tienen un flujo genético relativamente alto y una diversidad genética moderada. La mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones y la diferenciación genética entre poblaciones está influenciada por el flujo genético y la deriva genética. Sin embargo, la fragmentación de las poblaciones debido a acciones humanas puede afectar la diversidad genética. El análisis de los 12 marcadores SSR indica un flujo genético global de 2.89. La diferenciación genética entre las poblaciones es moderada y se encuentra relacionada tanto con la distancia geográfica como con la distancia genética, siendo la distancia genética más influyente. La estructura de la población de *D. stevensonii* está influenciada más por acciones humanas que por la ubicación geográfica.

Se determinó que la concentración óptima de BAP para la inducción de brotes en una colección núcleo in vitro de *D. stevensonii* es 2.5 mgL⁻¹ y la dosis ideal de IBA es 1.0 mgL⁻¹. Además, la combinación de BAP y ANA demostró mayor eficiencia. Para la conservación in vitro a largo plazo, se recomienda el uso de un medio MS basal con un suplemento del 4% de sorbitol, lo que asegura una sobrevivencia de al menos el 85% de las plantas durante 20 semanas. Después de este tiempo, se aconseja el trasplante a un nuevo medio con las mismas características para continuar con el proceso de conservación.

14 Referencias

- Abdul-Muneer, P. M. (2014). Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: Recent advances in population structure analysis and conservation strategies. *Genetics Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/691759>
- Addisalem, A. B., Duminil, J., Wouters, D., Bongers, F., & Smulders, M. J. M. (2016). Fine-scale spatial genetic structure in the frankincense tree *Boswellia papyrifera* (Del.) Hochst. and implications for conservation. *Tree Genetics and Genomes*, 12(5). <https://doi.org/10.1007/s11295-016-1039-2>
- Andrews, K. R., Good, J. M., Miller, M. R., Luikart, G., & Hohenlohe, P. A. (2016). Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 81–92. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Andrianoelina, O., Favreau, B., Ramamonjisoa, L., & Bouvet, J. M. (2009). Small effect of fragmentation on the genetic diversity of *Dalbergia monticola*, an endangered tree species of the eastern forest of Madagascar, detected by chloroplast and nuclear microsatellites. *Annals of Botany*, 104(6), 1231–1242. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp231>
- Basak, M., Uzun, B., & Yol, E. (2019). Genetic diversity and population structure of the Mediterranean sesame core collection with use of genome-wide SNPs developed by double digest RAD-Seq. *PLoS ONE*, 14(10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223757>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10592-004-7718-9>
- Boaventura-Novaes, C. R. D., Novaes, E., Mota, E. E. S., Telles, M. P. C., Coelho, A. S. G., & Chaves, L. J. (2018). Genetic drift and uniform selection shape evolution of most traits in *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). *Tree Genetics and Genomes*, 14(5). <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1289-2>

- Bougeard, S., & Dray, S. (2018). Supervised multiblock analysis in R with the ade4 package. *Journal of Statistical Software*, 86(1), 1–17. <https://doi.org/10.18637/jss.v086.i01>
- Buzatti, R. S. de O., Chicata, F. S. L., & Lovato, M. B. (2016). Transferability of microsatellite markers across six *Dalbergia* (Fabaceae) species and their characterization for *Dalbergia miscolobium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 69, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.07.017>
- Cerdas, L. V., & Guzmán, L. A. (2004). Organogénesis in vitro en *Dalbergia retusa* (Papilionaceae). *Revista de Biología Tropical*, 52(1), 41–46.
- Cervantes-Maldonado, A. (2016). La conservación del granadillo en México, una carrera contra el tiempo. In *Biodiversitas* (Issue 128, pp. 6–11).
- Cervantes, A., Linares, J., & Quintero, E. (2019). An updated checklist of the Mexican species of *Dalbergia* (Leguminosae) to aid in its conservation efforts. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, e902528. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2528>
- 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.
- 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.
- Dervishi, A., Jakše, J., Ismaili, H., Javornik, B., & Štajner, N. (2018). Comparative assessment of genetic diversity in Albanian olive (*Olea europaea* L.) using SSRs from anonymous and transcribed genomic regions. *Tree Genetics and Genomes*, 14(4). <https://doi.org/10.1007/s11295-018-1269-6>
- Doyle, J. J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin Botanical Society of America*, 19, 11–15.

- Ferrer, M. M., Eguiarte, L. E., & Montaña, C. (2004). Genetic structure and outcrossing rates in *Flourensia cernua* (Asteraceae) growing at different densities in the South-western Chihuahuan Desert. *Annals of Botany*, *94*(3), 419–426. <https://doi.org/10.1093/aob/mch159>
- Forest, F., Grenyer, R., Rouget, M., Davies, T. J., Cowling, R. M., Faith, D. P., Balmford, A., Manning, J. C., Procheş, Ş., Van Der Bank, M., Reeves, G., Hedderson, T. A. J., & Savolainen, V. (2007). Preserving the evolutionary potential of floras in biodiversity hotspots. *Nature*, *445*(7129), 757–760. <https://doi.org/10.1038/nature05587>
- Francis, R. M. (2017). pophelper: an R package and web app to analyse and visualize population structure. *Molecular Ecology Resources*, *17*(1), 27–32. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12509>
- Frankham, R., Ballou, J. D., & Briscoe, D. A. (2004). *A primer of conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Gadissa, F., Tesfaye, K., Dagne, K., & Geleta, M. (2018). Genetic diversity and population structure analyses of *Plectranthus edulis* (Vatke) Agnew collections from diverse agro-ecologies in Ethiopia using newly developed EST-SSRs marker system. *BMC Genetics*, *19*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12863-018-0682-z>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01210.x>
- Gichira, A. W., Li, Z. Z., Saina, J. K., Hu, G. W., Gituru, R. W., Wang, Q. F., & Chen, J. M. (2017). Demographic history and population genetic structure of *Hagenia abyssinica* (Rosaceae), a tropical tree endemic to the Ethiopian highlands and eastern African mountains. *Tree Genetics and Genomes*, *13*(4), 72. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1156-6>
- Goudet, J. (1995). Computer Note Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, *86*, 485–486.
- Grünwald, N. J., & Hoheisel, G. A. (2006). Hierarchical analysis of diversity, selfing, and genetic

- differentiation in populations of the oomycete *Aphanomyces euteiches*. *Phytopathology*, *96*(10), 1134–1141. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1134>
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., & Sherman-Broyles, S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, *6*(1–4), 95–124. <https://doi.org/10.1007/BF00120641>
- Hanson, T. R., Brunsfeld, 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03726.x>
- Hartvig, I., Czako, M., Kjær, E. D., Nielsen, L. R., & Theilade, I. (2015). The use of DNA barcoding in identification and conservation of rosewood (*Dalbergia* spp.). *PLoS ONE*, *10*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138231>
- Hartvig, I., So, T., Changtragoon, S., Tran, H. T., Bouamanivong, S., Theilade, I., Kjær, E. D., & Nielsen, L. R. (2018). Population genetic structure of the endemic rosewoods *Dalbergia cochinchinensis* and *D. oliveri* at a regional scale reflects the Indochinese landscape and life-history traits. *Ecology and Evolution*, *8*(1), 530–545. <https://doi.org/10.1002/ece3.3626>
- Hernández-López, J. A. (2016). *Trabajo de graduación realizado en la región de Alta Verapaz, Izabal y áreas aledañas sobre descripción general del ambiente y fenoogía de Caoba (Swietenia macrophylla King), Rosul (Dalbergia stevensonii Standl.), Granadill (D. tucurensis) y Cocobolo (D. Universidad de San Carlos de Guatemala.*
- Hodel, R. G. J., Segovia-Salcedo, M. C., Landis, J. B., Crowl, A. A., Sun, M., Liu, X., Gitzendanner, M. A., Douglas, N. A., Germain-Aubrey, C. C., Chen, S., Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (2016). The report of my death was an exaggeration: A review for researchers using microsatellites in the 21st century. *Applications in Plant Sciences*, *4*(6), 1600025. <https://doi.org/10.3732/apps.1600025>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02591.x>

- Javaid, A., Akram, W., Shoaib, A., Haider, M. S., & Ahmad, A. (2014). ISSR analysis of genetic diversity in *Dalbergia sissoo* in Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, *46*(5), 1573–1576.
- Jombart, T. (2008). Adegnet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, *24*(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, *1*, 94. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/1471-2156-11-94>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, X., Li, M., Hou, L., Zhang, Z., Pang, X., & Li, Y. (2018). De novo transcriptome assembly and population genetic analyses for an endangered Chinese endemic acer miaotaiense (Aceraceae). *Genes*, *9*, 378. <https://doi.org/10.3390/genes9080378>
- Liu, F. M., Zhang, N. N., Liu, X. J., Yang, Z. J., Jia, H. Y., & Xu, D. P. (2019). Genetic diversity and population structure analysis of *Dalbergia odorifera* germplasm and development of a core collection using microsatellite markers. *Genes*, *10*(4). <https://doi.org/10.3390/genes10040281>
- Loo, J. A. (2011). *Manual de genética de la conservación: principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad genética*. Conafor.
- Meirmans, P. G. (2020). Genodive version 3.0: Easy-to-use software for the analysis of genetic data of diploids and polyploids. *Molecular Ecology Resources*, *20*(4), 1126–1131. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13145>
- Mihretie, Z., Schueler, S., Konrad, H., Bekele, E., & Geburek, T. (2015). Patterns of genetic diversity of *Prunus africana* in Ethiopia: hot spot but not point of origin for range-wide diversity. *Tree Genetics and Genomes*, *11*(6). <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0945-z>
- Nhung, N. P., Chi, N. M., Thu, P. Q., Thuong, B. H., Ban, D. Van, & Dell, B. (2020). Market and policy setting for the trade in *Dalbergia tonkinensis*, a rare and valuable rosewood, in Vietnam.

- Trees, Forests and People*, 1(March), 100002. <https://doi.org/10.1016/j.tfp.2020.100002>
- Paradis, E., & Schliep, K. (2018). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*, 35, 526–528. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty633/5055127>
- 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.
- Phong, D. T., Hien, V. T. T., Thanh, T. T. V., Van, N. T., & Binh, N. Q. (2011). Genetic diversity on the tropical rare wood species of dalbergia in vietnam revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 10(55), 11397–11408. <https://doi.org/10.5897/AJB11.1892>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Puechmaille, S. J. (2016). The program structure does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem. *Molecular Ecology Resources*, 16(3), 608–627. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12512>
- Richter, H. G., Krause, U., & Muche, C. (1996). “Dalbergia congestiflora Standl.: Wood structure and physico-chemical properties compared with other Central American species of Dalbergia.” *IAWA Journal*, 17, 327–341.
- Ruíz-Mazariegos, P. I. (2017). *Estudio fenológico y botánico de las especies Swietenia macrophylla King., Dalbergia stevensonii Standl. y Dalbergia tucurensis Donn. Smith. en el departamento de Petén, diagnóstico y servicios prestados en el laboratorio forense forestal de la Fausac, Guatemala.*
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., & Smith, W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: Problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7(4), 465–474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00318.x>

- Song, Y., Zhang, Y., Xu, J., Li, W., & Li, M. F. (2019). Characterization of the complete chloroplast genome sequence of *Dalbergia* species and its phylogenetic implications. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56727-x>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.07.015>
- Vardeman, E., & Runk, J. V. (2020). Panama’s illegal rosewood logging boom from *Dalbergia retusa*. *Global Ecology and Conservation*, e01098. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01098>
- Vatanparas, M., Klitgard, B. B., Adema, F. A., Pennington, T., Yahara, T., & Kajita, T. (2013). First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: implications for infrageneric circumscription and biogeography. *South African Journal of Botany*, *89*, 143–149.
- Vendrami, D. L. J., Telesca, L., Weigand, H., Weiss, M., Fawcett, K., Lehman, K., Clark, M. S., Leese, F., McMinn, C., Moore, H., & Hoffman, J. I. (2017). RAD sequencing resolves fine-scale population structure in a benthic invertebrate: Implications for understanding phenotypic plasticity. *Royal Society Open Science*, *4*(2). <https://doi.org/10.1098/rsos.160548>
- Vu, D. D., Bui, T. T. X., Nguyen, M. D., Shah, S. N. M., Vu, D. G., Zhang, Y., Nguyen, M. T., & Huang, X. H. (2019). Genetic diversity and conservation of two threatened dipterocarps (Dipterocarpaceae) in southeast Vietnam. *Journal of Forestry Research*, *30*(5), 1823–1831. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0735-1>
- Vu Thi Thu Hien. (2012). Genetic diversity among endangered rare *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae) genotypes in Vietnam revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) and inter simple sequence repeats (ISSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, *11*(35), 8632–8644. <https://doi.org/10.5897/ajb11.3598>
- Winter, D. J. (2012). mmod: an R library for the calculation of population differentiation statistics. *Molecular Ecology Resources*, *12*(6), 1158–1160. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03174.x>

- Xu, D. P., Xu, S. S., Zhang, N. N., Yang, Z. J., & Hong, Z. (2019). Chloroplast genome of *Dalbergia cochinchinensis* (Fabaceae), a rare and Endangered rosewood species in Southeast Asia. *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 4(1), 1144–1145. <https://doi.org/10.1080/23802359.2019.1591190>
- Yamashita, H., Katai, H., Kawaguchi, L., Nagano, A. J., Nakamura, Y., Morita, A., & Ikka, T. (2019). Analyses of single nucleotide polymorphisms identified by ddRAD-seq reveal genetic structure of tea germplasm and Japanese landraces for tea breeding. *PLoS ONE*, 14(8), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220981>
- Zhai, S. H., Yin, G. S., & Yang, X. H. (2018). Population genetics of the endangered and wild edible plant *Ottelia acuminata* in Southwestern China using novel SSR markers. *Biochemical Genetics*, 56(3), 235–254. <https://doi.org/10.1007/s10528-018-9840-2>
- Zhong, T., Zhao, G., Lou, Y., Lin, X., & Guo, X. (2019). Genetic diversity analysis of *Sinojackia microcarpa*, a rare tree species endemic in China, based on simple sequence repeat markers. *Journal of Forestry Research*, 30(3), 847–854. <https://doi.org/10.1007/s11676-018-0660-3>
- Zhu, A. L. (2020). China's Rosewood boom: A cultural fix to capital overaccumulation. *Annals of the American Association of Geographers*, 110(1), 277–296. <https://doi.org/10.1080/24694452.2019.1613955>

15 Vinculación

La vinculación se realizó principalmente con las instituciones encargadas del manejo y protección de bosques de Guatemala que son el Instituto Nacional de Bosques y el Consejo Nacional de Áreas Protegidas, entidades que ha mostrado interés en el manejo y aprovechamiento sostenible de *D. stevensonii* con fines de exportación.

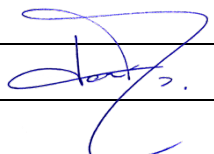
16 Estrategia de difusión, divulgación y protección intelectual

Los resultados de investigación se difundieron principalmente por medio de un manuscrito científico. Adicionalmente, se difundió información por el portal web del instituto de investigaciones y por las redes sociales del laboratorio de Biotecnología Vegetal de la FAUSAC.

17 Aporte de la propuesta de investigación a los ODS

Este estudio es el primero en su área, ya que se diagnostica la situación genética de una especie de interés biológico y comercial. Al trabajar con poblaciones silvestres *D. stevensonii* en la Franja Transversal Norte y Petén, se aportan datos de importancia para la conservación de los ecosistemas naturales guatemaltecos ya que se trata de una especie nativa de gran valor comercial. Adicionalmente, este estudio sirve como base para la elaboración de un plan de manejo, mejora genética y aprovechamiento sostenible de la especie en Guatemala.

18 Orden de pago final

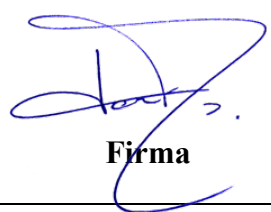
Nombres y apellidos	Categoría (investigador /auxiliar)	Registro de personal	Procede pago de mes (Sí / No)	Firma
José Alejandro Ruiz Chután	Investigador	20101034	Si	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-


19 Declaración del coordinador(a) del proyecto de investigación

El coordinador de proyecto de investigación con base en el *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación*, artículos 13 y 20, deja constancia que el personal contratado para el proyecto de investigación que coordina ha cumplido a satisfacción con la entrega de informes individuales por lo que es procedente hacer efectivo el pago correspondiente.

José Alejandro Ruiz Chután Coordinador del proyecto de investigación	 Firma
Fecha: 28/02/2023	

20 Aval del director(a) del instituto, centro o departamento de investigación o Coordinador de investigación del centro regional universitario

De conformidad con el artículo 13 y 19 del *Reglamento para el desarrollo de los proyectos de investigación financiados por medio del Fondo de Investigación* otorgo el aval al presente informe mensual de las actividades realizadas en el proyecto Diversidad genética de *Dalbergia stevensonii* en la Franja Transversal del Norte y Petén: bases para su conservación y mejoramiento en mi calidad de Coordinador del Insituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales, mismo que ha sido revisado y cumple su ejecución de acuerdo a lo planificado.


Vo.Bo. Carlos López Búcaro Director del Insituto de Investigaciones Agrícolas y Ambientales Facultad de Agronomía	 Firma
Fecha: 28/03/2022	

Informe final proyecto de investigación 2022

Dirección General de Investigación –DIGI-

21 Visado de la Dirección General de Investigación

Vo.Bo. M.Sc. Andrea Rodas Moran Coordinador del Programa Universitario de Investigación en Recursos Naturales y Ambiente	Firma
Fecha: 28/02/2022	

Vo.Bo. Ing. Agr. Julio Rufino Salazar Nombre Coordinador General de Programas Universitarios de Investigación	Firma  Ing. MARI Julio Rufino Salazar Pérez Coordinador General de Programas de Investigación, Digi-Usac
Fecha: 28/02/2022	