CATIE
Solutions for environment and development
Soluciones para el ambiente y desarrollo

TESIS DE MAESTRÍA ACADÉMICA

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Cedrela odorata L.* EN UNA MATRIZ AGROPECUARIA DEL PAISAJE CENTINELA NICARAGUA-HONDURAS Y SUS IMPLICACIONES PARA LA RESTAURACIÓN FORESTAL

Carlos Ernesto Palacios Mejía

2018

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL

DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

DIVISIÓN DE EDUCACIÓN

PROGRAMA DE POSTGRADO

Diversidad genética de C*edrela odorata* L. en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras y sus implicaciones para la restauración forestal

Por

Carlos Ernesto Palacios Mejía

Proyecto de Graduación sometido a consideración del Programa de Postgrado como requisito para optar al grado de

***Magister Scientiae* en**

Manejo y Conservación de Bosques Tropicales y Biodiversidad

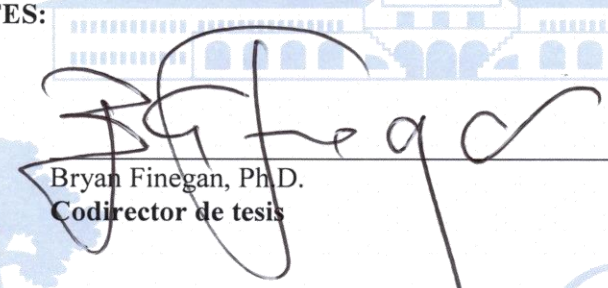
Turrialba, Costa Rica

2018

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y el Programa de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante, como requisito parcial para optar por el grado de

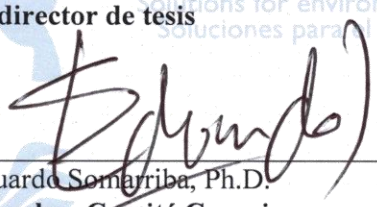
***MAGISTER SCIENTIAE* EN MANEJO Y CONSERVACIÓN DE BOSQUES TROPICALES Y BIODIVERSIDAD**

FIRMANTES:

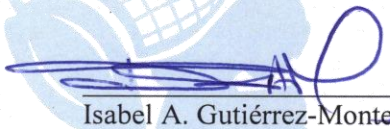


Bryan Finegan, Ph.D.
Codirector de tesis

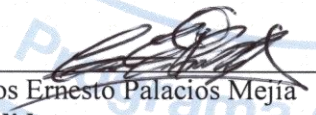
Maarten van Zonneveld, Ph.D.
Codirector de tesis



Eduardo Somarriba, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Isabel A. Gutiérrez-Montes, Ph.D.
Decana Programa de Posgrado



Carlos Ernesto Palacios Mejía
Candidato

Dedicatoria

A mi abuelo papa Chus,
Quien dejo un vacío muy grande en mi corazón,
pero me ha acompañado desde el infinito.

A mis padres y a mi hermano,
por apoyarme en todo momento
y estar siempre pendiente de mis avances.

A Isis,
Por estar a mi lado durante estos dos años
Y por todo el apoyo y cariño brindados.

Agradecimientos

A mis codirectores Maarten van Zonneveld y Bryan Finegan, por el seguimiento, apoyo y motivación durante todo este proceso de investigación.

A Marie Kalousová, por la amable atención brindada durante mi estadía en República Checa y por la paciencia al mostrarme paso a paso las diferentes técnicas para el análisis molecular.

A Eduardo Somarriba, por sus importantes aportes y disposición de colaboración.

A Bohdan Lojka, por el apoyo administrativo brindado durante mi estadía en República Checa.

A Norvin Sepúlveda, por su apoyo en la obtención de herramientas, permisos de extracción y exportación para el trabajo de campo.

A Hollman, Marvin, Oswaldo y Calef, por la amistad y ayuda brindada durante el proceso de identificación y recolección de muestras.

A Elodie Manca, Esther Bustillo y Natalia Ruiz, por ser una gran compañía durante los tiempos libres en el trabajo de campo.

A todos mis amigos en CATIE, por compartir su alegría y ayudar a liberar estrés con comida y actividades deportivas. Se les quiere mucho a todos.

A todos los profesores del CATIE, por el conocimiento impartido en estos dos años de estudio.

Al personal del Centro de Entendimiento con la Naturaleza (CEN), por su disposición de colaborar y darme la oportunidad de conocer las bellezas naturales del Macizo Peñas Blancas.

Al Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (CGIAR, por sus siglas en inglés), quienes a través del programa de Bosques, Árboles y Agroforestería (FTA) me brindaron el apoyo financiero para desarrollar una investigación genética y permitirme viajar hasta República Checa para capacitarme en este tipo de análisis.

Al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), por dar el apoyo financiero para la investigación, brindar una educación de excelencia y permitirme convivir en un ambiente intercultural sumamente enriquecedor.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por brindarme el apoyo financiero durante todo este proceso de aprendizaje. Con su ayuda, muchos jóvenes de escasos recursos tenemos la posibilidad de adquirir nuevos conocimientos que en un futuro ayudarán a mejorar la calidad de vida de las personas y los seres vivos en general.

Tabla de contenido

1. Introducción 1
1.1. Antecedentes 1
1.2. Justificación 2
1.3. Objetivos de investigación 4
1.3.1. Objetivo general 4
1.3.2. Objetivos específicos 4
1.4. Preguntas de investigación 4
1.4.1. Pregunta de investigación 1 4
1.4.2. Preguntas de investigación 2 4
1.4.3. Pregunta de investigación 3 4
1.5. Marco referencial 5
1.5.1. Descripción de la especie 5
1.5.2. Diversidad genética 6
1.5.3. Procesos evolucionarios que influyen en la diversidad genética 7
1.5.4. Variabilidad genética de *C. odorata* 8
1.5.5. Marcadores moleculares 11
1.6. Resultados 13
1.7. Conclusiones 14
1.8. Literatura citada 15
2. Artículo: Diversidad genética de C*edrela odorata* L. en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras y sus implicaciones para la restauración forestal ... 23
2.1. Resumen 23
2.2. Introducción 23
2.3. Metodología 25
2.3.1. Área de estudio 25
2.3.2. Procedimientos metodológicos en campo 26
2.3.3. Procedimientos metodológicos en laboratorio 27
2.3.4. Definición de grupos genéticos 28
2.3.5. Análisis de diversidad genética 28
2.4. Resultados 30
2.4.1. Diversidad genética de *C. odorata* según rasgos fenotípicos y ambientales .. 30
2.4.2. Estructura genética poblacional 32
2.4.3. Diversidad genética de las subpoblaciones A, B y C 33

2.4.4. Caracterización fenotípica y ecogeográfica de subpoblaciones 34
2.4.5. Ubicación geográfica de subpoblaciones 36
2.5. Discusión 38
2.5.1. Diversidad genética poblacional 38
2.5.2. Factores fenotípicos y ecogeográficos como criterio de clasificación 38
2.5.3. Identificación de subpoblaciones por *Structure* 39
2.5.4. Aplicación de resultados genéticos para el manejo poblacional de *C. odorata* en un paisaje fragmentado, considerando el componente genético como una fuente potencial de semillas para restauración y conservación *Circa situm* 41
2.6. Conclusiones y recomendaciones 42
2.7. Agradecimientos 43
2.8. Literatura citada 43

Índice de cuadros

Cuadro 1. Caracterización de 10 marcadores SSR utilizados para el análisis de diversidad genética de *Cedrela odorata* (Hernández *et al*. 2008) 13

Cuadro 2. Análisis descriptivo de la diversidad genética de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras 30

Cuadro 3. Análisis descriptivo de la diversidad genética para el estado fenológico, procedencia y DAP de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras 31

Cuadro 4.Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 10 marcadores microsatélites y 3 subpoblaciones de *C. odorata* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras 33

Cuadro 5. Análisis descriptivo de la diversidad genética para subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. 34

Índice de figuras

Figura 1. Distribución de dos haplotipos para las poblaciones de *C. odorata* en diferentes ambientes de Costa Rica. Negro= haplotipo A y blanco = haplotipo B (Cavers *et al*. 2003).9

Figura 2. Distribución de la variación de ADN cloroplástico en poblaciones de *C. odorata* para Mesoamérica. Círculos negros: haplotipos para México y Guatemala; círculos blancos: haplotipos para Honduras, Nicaragua y noroeste de Costa Rica; círculos grises: haplotipos para el resto de Costa Rica y Panamá (Cavers *et al*. 2004). 10

Figura 3. Matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras, Nicaragua. Gris: matriz agropecuaria, verde: áreas naturales protegidas; cuadros negros: ubicación de los 728 individuos identificados y puntos verdes: muestras seleccionadas. 26

Figura 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras según el criterio uso de suelo. Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre los diferentes usos de suelo de la matriz; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos. 30

Figura 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras para los criterios 1) Estado fenológico (reproductivos y vegetativos); 2) Procedencia (regeneración natural y plantados) y 3) DAP (menores a 60 cm y mayores a 60 cm). Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre las diferentes categorías de cada criterio; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos. 31

Figura 6. Identificación del ΔK más probable calculado por el programa *Structure* para la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. 32

Figura 7. Asignación de probabilidades para las 164 muestras de *C. odorata* en cada grupo inferido por *Structure* para el número de poblaciones (K)=2-5. Cada muestra está representada por una línea vertical y su longitud indica la probabilidad de pertenecer a cada subpoblación; cada color en la gráfica representa una posible subpoblación. 32

Figura 8. Representación gráfica del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las tres subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre las subpoblaciones; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos. 33

Figura 9. Prueba T apareada disponible en Info Gen para la heterocigosidad esperada (He) en cada subpoblación de *C. odorata* en una matriz del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras Números diferentes indican diferencias significativas (P<0,05). 34

Figura 10. Tipificación de la categoría uso de suelo para las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. A, B y C representan las subpoblaciones identificadas 35

Figura 11. Tipificación de variables categóricas para las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. El gráfico izquierdo representa el porcentaje de árboles para la categoría estado fenológico (vegetativos y reproductivos) y el derecho el porcentaje de árboles para la categoría procedencia (plantados y regenerados de forma natural). 35

Figura 12. Prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher para las variables DAP (izquierda) y altura de los árboles (derecha) entre las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01). 36

Figura 13. Prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher para la variable altitud (msnm) entre las diferentes subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01). 36

Figura 14. Representación de la Prueba LSD de Fisher aplicada a las coordenadas latitudinales (izquierda) y longitudinales (derecha) de los árboles de las subpoblaciones de *C. odorata* de una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01). 37

Figura 15. Ubicación geográfica de las subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Círculos celestes: subpoblación A; círculos morados: subpoblación B; círculos naranjas: subpoblación C. Círculo grande celeste indica el sitio de mayor agrupación de la subpoblación A. 37

Lista de acrónimos, abreviaturas y unidades

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AFLP: Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados

AMOVA: Análisis de varianza molecular

ANOVA: Análisis de varianza

°C: Grados Celsius

CEN: Centro de Entendimiento con la Naturaleza

DAP: Diámetro a la altura del pecho

FRA: Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales

F_{ST}: Coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones

ha: Hectárea

He: Heterocigosidad esperada no sesgada

Ho: Heterocigosidad observada

Inafor: Instituto Nacional Forestal de Nicaragua

IPCC: Panel Intergubernamental de Cambio Climático

Marena: Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de Nicaragua

MEA: Evaluación de los ecosistemas del milenio

msnm: Metros sobre el nivel del mar

Ne: Número de alelos efectivos

NHSL: Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras

PCR: Reacción en cadena de la Polimerasa

AP: Alelos privados

RAPD: Amplificación Aleatoria de AND Polimórfico

RFLP: Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción

SSR: Secuencias simples repetidas (microsatélites)

Glosario

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): Fragmento amplificado de longitud polimórfica. Es un tipo de marcador molecular que involucra la amplificación de un conjunto específico de fragmentos de restricción mediante PCR utilizando un precursor marcado.

Haplotipo: Conjunto de alelos de loci estrechamente ligados y que generalmente se heredan como una unidad.

Heterocigotos: Se refiere a la existencia de diferentes alelos en un locus. Por ejemplo, A_1A_2.

Homocigotos: Se refiere a la existencia de alelos iguales en un locus. Por ejemplo, son homocigotos los genotipos A_1A_1.

Heterocigosidad total (HT): Es la heterocigosidad esperada si todas las poblaciones se agrupan sin subdivisiones (como una única población).

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Amplificación aleatoria de ADN polimórfico. Es un tipo de marcador molecular que involucra la visualización de fragmentos de DNA de diferentes tamaños generados por PCR utilizando partidores de secuencia arbitraria y electroforesis.

Codominancia: Condición en la cual el heterocigoto exhibe el fenotipo de ambos alelos.

Epistasis: Interacción entre alelos presentes en diferentes locus. Ocurre cuando dos pares de genes afectan la misma característica, pero uno de ellos en una determinada condición enmascara el efecto del otro par.

Aloenzimas: Formas alternativas de una proteína detectada por electroforesis que se deben a alelos alternativos en un solo locus. A menudo son conocidos como isoenzimas.

Enzimas de restricción: Enzima que reconoce una secuencia específica entre 4 a 6 pares de bases de ADN y corta un enlace fosfodiéster en cada una de las hebras.

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena de polimerasa es un método de amplificación enzimática de secuencias específicas de DNA.

SSR (Simple Sequence Repeat): Secuencia Simple Repetida, también conocido como microsatélite. Es un tipo de marcador molecular que involucra amplificación por PCR de secuencias de DNA seleccionadas repetidas en tándem.

Resumen

En la actualidad, se desarrollan proyectos de restauración ecológica que van desde la plantación de árboles en áreas urbanas hasta la restauración de ecosistemas completos. El conocimiento adecuado de las poblaciones o ecosistemas sobre los que se trabaja es de importancia para la correcta implementación de estrategias de conservación y restauración, ya que la información genética de las poblaciones puede ayudar a priorizar la restauración de áreas con reducidos niveles de diversidad genética y puede contribuir a mejorar la selección del germoplasma con mayor potencial genético para reforestación.

Esta investigación se enfoca en la diversidad genética poblacional de la especie *Cedrela odorata* en una matriz agropecuaria de 50 000 ha del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Las muestras de cambium de 164 árboles fueron recolectadas entre los meses marzo a mayo del 2017 y se analizaron con 10 marcadores microsatélites (SSR).

Los resultados mostraron bajos niveles de heterocigosidad observada (Ho=0,40) y una riqueza alélica promedio A=18,90. Los criterios seleccionados *a priori* no mostraron valores de diferenciación genética grandes en la población; sin embargo, el análisis con el programa *Structure* identificó una mayor probabilidad para tres subpoblaciones interactuando en el área de estudio (ΔK=3). El AMOVA para este análisis mostró una diferenciación genética alta entre las subpoblaciones (F_{ST} = 0,30 y P<0,001). La prueba T determinó que una de las subpoblaciones era significativamente menos diversa (He=0,372) que las otras dos (He=0,745 y He=0,696). Cada subpoblación fue caracterizada con el uso de variables fenotípicas y ambientales; se determinó que el estado fenológico y la altitud (msnm), presentaban valores diferentes para la subpoblación con menos diversidad genética con respecto a las subpoblaciones con mayor diversidad. Se identificaron subpoblaciones que necesitan una priorización en cuanto a restauración de su diversidad genética y subpoblaciones con altos niveles de diversidad genética que pueden considerarse como posibles fuentes de germoplasma, si se comprenden adecuadamente las causas de la alta estructura genética.

Palabras clave: Microsatélites, Paisaje Centinela, genética del paisaje, genética de la restauración, selección de germoplasma, estructura genética.

Abstract

Currently, different ecological restoration projects are being developed, ranging from planting trees in urban areas to the restoration of complete ecosystems. Adequate knowledge of the populations or ecosystems on which work has been done is important for the adequate implementation of conservation and restoration strategies, as the genetic information on populations should help to prioritize the restoration of areas with reduced levels of genetic diversity and contribute to improve the selection of germplasm with a greater genetic potential for forest restoration.

This study is focused on the population genetic diversity of the species *Cedrela odorata* in an agricultural matrix of 50 000 ha, located in the Sentinel Landscape of Nicaragua-Honduras. The cambium samples of 164 trees were collected between March and May 2017 and samples were analyzed with 10 microsatellite markers (SSR).

The results show low levels of observed Heterozygosity (Ho = 0,40) and an average allelic richness A = 18,90. The criteria selected a *priori* have not shown large genetic differentiation values in the population; however, analysis with the *Structure* program has identified a high probability of three subpopulations interacting in the study area (ΔK=3). The AMOVA for this analysis shows a high genetic differentiation between the subpopulations (FST = 0,30 and P <0.001). A T-test has determined that one of the subpopulations was significantly less diverse (He = 0,372) than the other two subpopulations (He=0,745 y He=0,696, respectively). Each population was characterized with the use of phenotypic and environmental variables, determining that the phenological status and altitude (msnm) showed different values for the subpopulation with less genetic diversity in regard to subpopulations with greater genetic diversity. Subpopulations that need prioritization in terms of restoration of their genetic diversity were identified, as were subpopulations with higher levels of genetic diversity that may be considered as possible germplasm sources, if the causes of the high genetic structure are understood adequately.

Key words: Microsatellites, Sentinel Landscape, landscape genetics, genetic restoration, germplasm selection, genetic structure.

1. Introducción

1.1. Antecedentes

Anualmente se degradan extensas áreas de bosque a nivel mundial. Entre el 2010 y 2015 hubo una pérdida neta de bosque natural (bosques primarios y regenerados de forma natural) estimada en 6,6 millones de hectáreas por año aproximadamente (FAO 2015). Mientras que, en un contexto local, Nicaragua en el 2008 registró pérdidas de 85 329 ha de bosque por año (Marena 2016). La expansión de monocultivos como algodón, ganadería extensiva y agricultura migratoria son los impulsores de aproximadamente el 70% de dicha deforestación (Orozco y López 2013, Armenteras *et al*. 2015), lo cual dejó para el 2008 un 25% del territorio nacional cubierto por bosque (3 254 145 ha) (Inafor 2009, Armenteras *et al.* 2015).

Como producto de la deforestación se han creado mosaicos con parches de bosques primarios, secundarios y riparios inmersos en una matriz de potreros y otros usos de suelo (Sánchez *et al*. 2004, Orozco y López 2013); dicha fragmentación provoca un aislamiento de las poblaciones e influye en la modificación de los patrones de diversidad, flujo y estructura genética poblacional (Templeton *et al.* 1990, Ledig 1992, Baucom *et al*. 2005, Hanson *et al*. 2008, Davies *et al*. 2013).

La pérdida de diversidad genética en poblaciones pequeñas y aisladas reduce la capacidad adaptativa, disminuye la aptitud reproductiva y modifica las frecuencias genotípicas poblacionales con un aumento en el número de homocigotos a causa del incremento en el cruzamiento endogámico (Frankham *et al*. 2004, Loo 2011).

Dos factores que influyen en los cambios de las frecuencias alélicas y genotípicas a nivel poblacional son los cuellos de botella y la deriva genética aleatoria. El primero actúa reduciendo la cantidad de individuos de la población durante los procesos de fragmentación, dejando solo una pequeña muestra del conjunto de genes original; mientras que la deriva genética influye en la pérdida continua de genes en poblaciones que permanecen aisladas por largos periodos de tiempo (Wilcove *et al*. 1986, Young *et al*. 1996).

Especies como *Cedrela odorata*, con alto valor comercial, sobreexplotadas y con bajos niveles de regeneración natural pueden mostrar efectos más significativos en la divergencia genética (estructura genética), que especies con grandes tamaños poblacionales (Ellstrand y Elam 1993, Vásquez *et al*. 1999, Cordero *et al*. 2003, Frankham *et al*. 2004, Inafor 2009). Sin embargo, los árboles de *C. odorata* fuera de los fragmentos de bosques remanentes pueden ofrecer importantes beneficios para el flujo de genes y pueden ayudar a mantener la viabilidad de las poblaciones y sus capacidades adaptativas, de igual forma como se ha comprobado en especies como: *Swietenia humilis, Vochysia ferruginea, Dipteryx panamensis, Swietenia macrophylla,* entre otras (Ellstrand y Elam 1993, White *et al*.1999, White *et al*. 2002, Céspedes *et al*. 2003, Hanson *et al*. 2008, Lander *et al*. 2010, Davies *et al*.

2013). Esto constituye una opción de conservación fuera del área natural, pero dentro de sectores de producción (conservación *Circa situm*) (Boshier *et al.* 2004).

Las investigaciones genéticas desarrolladas para esta especie han indagado parámetros de diversidad alfa (riqueza alélica y diversidad genética) y beta (estructura genética), con el fin de comprender y explicar los efectos del aislamiento y los cambios ambientales en la variabilidad y estructura genética poblacional (Navarro y Vásquez 1986, Young *et al*. 1996, Navarro *et al*. 2005, Cavers *et al*. 2003, Eguiarte *et al.* 2010).

1.2. Justificación

La presente investigación se desarrolló en el Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras (NHSL), el cual forma parte de una red de siete paisajes distribuidos alrededor del mundo y que difieren en sus condiciones biofísicas, culturales y socioeconómicas. El objetivo de estos territorios es realizar investigaciones que permitan evaluar y comparar los procesos que provocan cambios en la cobertura arbórea, los efectos del cambio de uso de suelo y las alternativas para mejorar las condiciones ecológicas y sociales del territorio (NHSL 2016).

Este estudio se enfoca en la especie *Cedrela odorata* dentro de dicho paisaje centinela, con el fin de entender la variación genética de una especie que ha sufrido reducción en el tamaño poblacional a causa de la tala selectiva, el cambio de uso de suelo y la fragmentación de los bosques (Marena e Inafor 2002, Cordero *et al*. 2003, Inafor 2009).

La información genética generada en este tipo de investigaciones puede ayudar a identificar poblaciones con alta o baja diversidad genética, así como sitios con mayor cruzamiento endogámico. Esto ayudaría a mejorar la toma de decisión en cuanto a planes de manejo y programas de restauración forestal (Gallo *et al*. 2009, Azpilicueta *et al*. 2011), ya que se tendría el conocimiento acerca poblaciones frágiles en las que se necesite aumentar el tamaño poblacional para reducir la endogamia, mejorar la conectividad para evitar la erosión genética y seleccionar los sitios más adecuados para el establecimiento de semilleros con alta aptitud reproductiva (Frankham *et al*. 2004).

Thomas *et al*. (2014), mencionan que es importante incorporar el componente genético en los procesos de restauración, ya que esto mejora la probabilidad de que los ecosistemas restaurados prosperen y continúen brindando servicios en el futuro. Por el contrario, si no se tiene en cuenta la diversidad genética, los ecosistemas pueden no ser autosustentables y las poblaciones pueden tener una capacidad limitada de adaptación a los cambios ambientales; además, la endogamia puede convertirse en un factor limitante de la restauración.

La importancia de *C. odorata* para Nicaragua fue destacada en el Inventario Nacional Forestal (INF) del 2008, donde se le dio a conocer como una de las especies maderables más

demandadas por los productores y dueños de bosque para reforestar sus terrenos mediante plantación de árboles en fincas y mediante la creación de sistemas agroforestales (Inafor 2009). Además de lo anterior, la especie se encuentra en el apéndice III de la lista roja de la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES), propuesta por 38 países, incluyendo Nicaragua (CITES 2018).

La necesidad de conocer cómo se estructura la variación genética de la especie en un paisaje fragmentado también es importante desde el punto de vista económico, debido a que históricamente *C. odorata* ha sido la segunda especie de mayor valor económico del continente después de *Swietenia macrophylla* (caoba) y países como Bolivia, Brasil y Perú logran exportar madera de cedro con precios hasta de US$996 el m^3 (Pérez 2011).

Además de contribuir al conocimiento sobre la influencia de la fragmentación en Nicaragua y cómo esta afecta los recursos genéticos de la especie, este estudio ayudará a sentar las bases para el cumplimiento de la meta 13 del plan estratégico para la diversidad biológica 2011-2020 y las metas de Aichi, en el cual se menciona que para el 2020 se deben desarrollar estrategias para reducir la erosión genética y salvaguardar la diversidad genética de las especies, en especial las que se encuentran amenazadas o con poblaciones en declive como es el caso de *C. odorata* (CBD 2010).

La presente investigación se desarrolló en el Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras, específicamente entre los municipios Tuma-La Dalia y Rancho Grande, Matagalpa, Nicaragua. Se realizó un análisis de diversidad genética de la población de *C. odorata*; para lo cual se recolectaron 164 muestras de la población de cedros, las cuales fueron secuenciadas con 10 marcadores moleculares microsatélites (SSR) en el laboratorio de Biología Celular y Molecular de Czech University of Life Sciences Prague (República Checa). El principal objetivo de la investigación fue contribuir al conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones de cedro de Nicaragua.

1.3. Objetivos de investigación

1.3.1. Objetivo general

Contribuir al conocimiento sobre estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Cedrela odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras y determinar sus implicaciones para la restauración forestal.

1.3.2. Objetivos específicos

Identificar la estructura poblacional para la especie *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

Determinar los niveles de riqueza y diversidad genética para la población de *C. odorata* en el área de estudio.

Determinar la influencia de factores ambientales en la estructura y diversidad genética de la población *C. odorata* en el área de estudio.

1.4. Preguntas de investigación

1.4.1. Pregunta de investigación 1

- ¿Cuál es la variabilidad genética de una muestra de 164 árboles de *C. odorata* en una matriz agropecuaria?

1.4.2. Preguntas de investigación 2

- ¿Existe una estructura genética poblacional influenciada por el uso de suelo, estado fenológico, procedencia y DAP en la población de *C. odorata* del área de estudio?
- ¿Hay una estructura genética poblacional determinada por la riqueza alélica y la diversidad genética en la población de *C. odorata* del área de estudio?

1.4.3. Pregunta de investigación 3

- Si existe una estructura genética grande en el área de estudio, ¿El uso de suelo, el estado fenológico, la procedencia, DAP, la altura y altitud pueden ayudar a explicar dicha divergencia poblacional?

1.5. Marco referencial

1.5.1. Descripción de la especie

Cedrela odorata L. 1753, es una especie de la familia Meliaceae nativa de Centroamérica, conocida comúnmente como "cedro amargo" (Costa Rica), "cedro cebolla", "cedro real" (Nicaragua), "cedro colorado" (El Salvador), entre otros (Salazar *et al*. 2000, Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba 2013).

La especie posee hojas lenticeladas, paripinnadas y raras veces imparipinnadas con 6 a 12 pares de foliolos; las inflorescencias se disponen en panículas de 20-40 (50) cm de largo y con flores con un olor muy fuerte a ajo. La corteza del árbol adulto es fisurada longitudinalmente y pueden alcanzar alturas de 55 m y diámetros de hasta 1,5 m (Zamora 2002).

La fenología de la especie es variable y depende de la región en la que se encuentre. Según Cordero *et al.* (2003), la especie generalmente produce frutos entre febrero y abril, siendo abril el mes idóneo para recolectarlos. Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba (2013), establecen que las poblaciones del valle Central de Costa Rica desfolian de diciembre a abril y producen frutos de enero a abril, siendo este el momento propicio para recolectar las semillas. En Nicaragua se mencionan enero y febrero como los meses más adecuados para la recolección de frutos (Patiño 1997, Marena e Inafor 2002, Rivas 2004).

La especie se distribuye desde el sur de México hasta el Norte de Argentina, incluidas las islas del Caribe, a una altitud entre los 0 y 800 msnm (Marena e Inafor 2002); sin embargo, en Costa Rica se puede encontrar hasta un máximo de 1200 msnm (Rojas-Rodríguez y Torres-Córdoba 2013). Se ubica en sitios con 1200 a 3000 mm de precipitación anual (Holdridge 1976, Cintrón 2000) y se desarrolla óptimamente en climas estacionalmente secos, con suelos bien drenados y derivados de piedra caliza (Cintrón 2000, Marena e Inafor 2002, Pavón *et al.* 2003, Rivas 2004).

C. odorata se encuentra en el apéndice III de la lista de especies CITES (Muellner *et al.* 2009, CITES 2018), debido a que la sobreexplotación, la explotación selectiva, el avance de la frontera agrícola y la deforestación en general han causado considerables reducciones en sus tamaños poblacionales y es más fácil encontrar la especie en patios, cafetales, potreros u otros tipos de sistemas agroforestales que en bosques naturales (Patiño 1997, Navarro *et al.* 2004, Esquivel *et al*. 2009, Almendarez *et al*. 2013, Amores 2015).

1.5.2. Diversidad genética

La diversidad genética es entendida como la variedad de alelos y genotipos diferentes en un grupo de estudio, ya sea una población, una especie o un grupo de especies; la expresión de dichas variaciones puede ser a nivel morfológico, fisiológico o no existir manifestación fenotípica presentándose simplemente variaciones a nivel de genes no codificantes en el ADN (Young *et al*.1996, Frankham *et al*. 2004).

La importancia de la diversidad genética no solo se relaciona con la capacidad adaptativa de las poblaciones o los procesos evolucionarios, sino también con diferentes procesos ecológicos como la productividad primaria, la competencia interespecífica y los flujos de energía y nutrientes (Hughes *et al*. 2008). Por esto, el conocimiento y la aplicabilidad de la diversidad genética está relacionada con la mejora en planes de manejo y procesos de restauración, siendo importante para asegurar la capacidad de adaptación de las plántulas y la autosostenibilidad de las poblaciones reforestadas (Azpilicueta *et al*. 2011, Thomas *et al*. 2014).

El riesgo de erosión genética se incrementa en las poblaciones con pequeños tamaños poblacionales, especialmente por la intensificación de la endogamia y deriva genética (Ellstrand y Elam 1993). Por esto, especies amenazadas o en peligro de extinción tienden a tener menor diversidad genética que especies no amenazadas (Frankham *et al*. 2004). Cuando se habla de restauración forestal es preferible la selección de germoplasma con alta diversidad genética, ya que la introducción de semillas con baja diversidad genética podría provocar en la población una reducción de la capacidad adaptativa (Thomas *et al.* 2014).

No obstante, la erosión genética, la pérdida de variabilidad y la consecuente disminución de la capacidad adaptativa causada por la fragmentación (Azpilicueta *et al*. 2011), puede ser solventada en cierto grado con estrategias de conservación que tomen el ambiente antropogénico como oportunidad de conservación (conservación *Circa situm*). Altos niveles de conservación genética pueden ser alcanzados tomando en cuenta la disponibilidad de los finqueros para reforestar sus terrenos con especies tropicales (Boshier *et al*. 2004).

La diversidad genética poblacional es comúnmente expresada en términos de riqueza alélica (frecuencias alélicas) y diversidad genética, la cual se relaciona principalmente con los niveles de heterocigosidad de la población, ya sea heterocigosidad esperada (He) o heterocigosidad observada (Ho). Donde la He muestra la cantidad promedio de individuos heterocigotos que deberían existir en una población en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que la Ho muestra el promedio del conteo directo de la cantidad de individuos heterocigotos dentro de una población (Frankham *et al*. 2004).

La estructura genética poblacional expresa el grado de divergencia que existe entre poblaciones; se calcula por medio del análisis de varianzas moleculares (ANOVA) y se

expresa por medio de un coeficiente de diferenciación genética (F_{ST}) (Peakall y Smouse 2015). Según Wright (1965) el 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).

1.5.3. Procesos evolucionarios que influyen en la diversidad genética

La evolución de las especies implica cambios en las frecuencias de sus alelos debido a la mutación, flujo genético, deriva genética y selección natural (Curtis *et al*. 2006). Los marcadores microsatélites usados en este estudio permitieron entender la variación genética en el paisaje centinela, así como la estructura poblacional relacionada con el flujo genético y la deriva genética.

- **Mutación**

La mutación puede ser entendida como los cambios en alelos o cromosomas y constituye el origen de toda la diversidad genética; nuevas variantes genéticas pueden ser originadas por errores en la replicación de ADN, elementos genéticos móviles, roturas cromosómicas, etc. (Frankham *et al*. 2004).

Las mutaciones pueden ocurrir al azar en cualquier momento y en cualquier célula de un organismo. Se clasifican según dos tipos: las mutaciones génicas que provocan cambios a nivel de alelos y generan nuevas variantes alélicas y las mutaciones cromosómicas que provocan cambios en secciones específicas de los cromosomas y en cromosomas enteros. Las mutaciones se pueden presentar tanto en células somáticas como o en células reproductoras y su manifestación fenotípica puede ser beneficiosa, neutra o dañina para el organismo (Griffiths *et al*. 2000).

- **Flujo genético**

Entre los problemas causados por la fragmentación y el aislamiento de individuos o poblaciones de una especie se encuentra las perturbaciones al flujo genético, el cual es definido como el movimiento de genes entre poblaciones. En las plantas es mediado por el movimiento de los gametos masculinos (dentro del polen) y de los zigotos (dentro de la semilla) (Loo 2011, Nora *et al.* 2011).

Investigaciones han demostrado que barreras físicas como áreas de ganado, cultivos, infraestructura y el clima, entre otros, impiden el libre movimiento del polen entre las plantas, lo que promueve una diferenciación genética entre poblaciones aisladas (Cavers *et al.* 2003, Boshier 2011), Sin embargo, el aislamiento de los individuos puede ser reducido con la utilización de árboles en potreros. Por ejemplo, White *et al.* (2002), determinó la importancia de los árboles aislados en pasturas para el flujo genético de la especie *Swietenia humilis*, en un paisaje fragmentado en Punta Ratón, Choluteca, Honduras. En esta investigación se identificó un árbol de *Swietenia humilis* separado por 1,1 km del fragmento más cercano, el

cual contribuía activamente al flujo de polen hasta una distancia de 4,5 km. Similares resultados obtuvieron Hanson *et al.* (2008) en Costa Rica para la especie *Dipteryx panamensis*, con flujos genéticos de hasta 2,3 km de distancia en árboles ubicados en pastos aislados de fragmentos de bosques.

- **Selección natural**

Son las alteraciones en la tasa de natalidad y reproducción que se ven alteradas debido a los cambios ambientales naturales. La reproducción diferencial y la supervivencia de los genotipos conducen a un cambio evolutivo adaptativo (Frankham *et al.* 2004). La selección natural determina cuales genotipos son más adecuados para la supervivencia y la reproducción de las especies y por ende los alelos que representen una mayor aptitud serán más frecuentes en la población (Griffiths *et al*. 2000).

- **Deriva genética**

Son los cambios en la composición genética de una población debido al muestreo aleatorio en poblaciones pequeñas. Conduce a la pérdida de diversidad genética, así como a la manifestación de divergencias entre poblaciones (Frankham *et al*. 2004). Se manifiesta más intensamente en poblaciones con un reducido tamaño poblacional (Rich *et al*. 1979, Cabrero y Camacho 2002) y como resultado final la deriva genética conduce a la fijación o eliminación de alelos por simple azar, lo que provoca aumentos en los promedios de homocigotos en las poblaciones (Griffiths *et al*. 2000).

Una forma de deriva genética se observa cuando un grupo de individuos se separa de una población de mayor tamaño ya sea por migración, aislamiento (fragmentación), reducción poblacional (cuellos de botella) u otros. Al fundar una nueva colonia, estos individuos solo poseen una pequeña muestra del conjunto de los genes originales de toda la población (efecto fundador) y mientras las condiciones no permitan a la población aumentar el número de individuos el azar sigue fijando o eliminando alelos de la población (Griffiths *et al*. 2000).

1.5.4. Variabilidad genética de *C. odorata*

A nivel del continente americano, se han desarrollado diferentes investigaciones para tratar de entender la variabilidad genética de las poblaciones de cedro real, tomando en cuenta diferentes tipos de marcadores, desde rasgos morfológicos hasta marcadores moleculares.

En poblaciones de *C. odorata* de ambientes mésicos y secos de Costa Rica Navarro *et al*. (2002), identificaron diferencias significativas en rasgos morfológicos como el peso de semillas, altura, DAP y tamaño de foliolos, entre otros. Esto mostró una separación

geográfica de las poblaciones, dividiéndose en poblaciones del Pacífico Norte y otras del pacífico sur y Caribe (Figura 1).

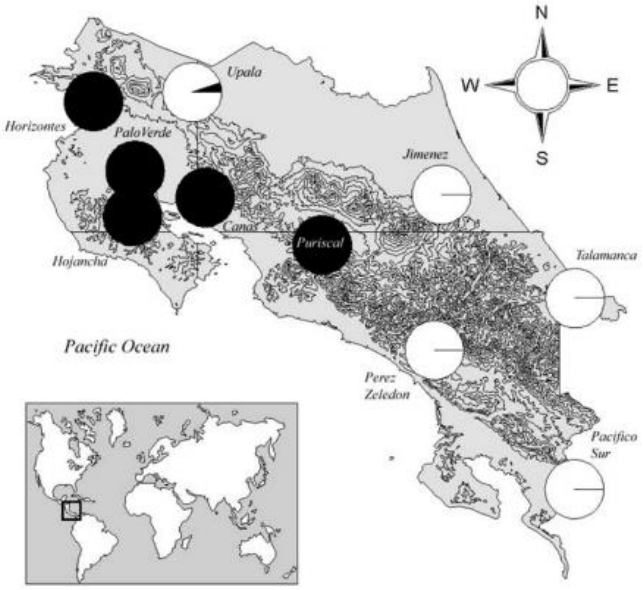


Figura 1. Distribución de dos haplotipos para las poblaciones de *C. odorata* en diferentes ambientes de Costa Rica. Negro= haplotipo A y blanco = haplotipo B (Cavers *et al*. 2003).

La diversidad genética difiere entre las poblaciones de *C. odorata* de Costa Rica. En las poblaciones del Pacífico Norte la diversidad genética es mayor que las del resto de Costa Rica, como lo demostraron Cavers *et al*. (2003) utilizando marcadores AFLP en 10 poblaciones estudiadas previamente por Navarro *et al*. (2002). Además Cavers *et al.* (2003), identificaron que las poblaciones de cada ecotipo se fijaban para un solo haplotipo de cloroplasto (conjunto de variaciones de ADN presentes en un solo grupo poblacional) y niveles de heterocigosidad total HT=0,27.

En la Amazonía peruana se han encontrado moderados niveles de diversidad genética (HT=0,22) con la utilización del mismo tipo de marcadores moleculares (AFLP). Esto ha sugerido que, a pesar de la deforestación y los altos niveles de perturbación circundante, la especie es capaz de mantener un flujo genético constante entre sus individuos (de la Torre *et al*. 2008).

Los marcadores microsatélites para el estudio de *C. odorata* fueron generados por Hernández *et al*. (2008), cuya investigación buscaba ayudar en el análisis sobre la genética poblacional de *C. odorata*. Los resultados de estos autores mostraron ámbitos entre 14 y 30 alelos por locus, así como niveles de heterocigosidad observada entre 0,61 y 0,88. Además de estas investigaciones, Cavers *et al*. (2004) desarrollaron un estudio a gran escala en toda Mesoamérica utilizando ADN nuclear y de cloroplasto. Los resultados de su investigación mostraron una variabilidad de haplotipos presentes en toda la región; el primer haplotipo se encuentra comprendido entre Yucatán (México), Honduras, Nicaragua y Noroeste de Costa Rica y el segundo, entre el resto de Costa Rica y Panamá. Sin embargo, el ADN de cloroplasto mostró la presencia de cinco haplotipos en la región y que dividen a *C. odorata* en tres grupos: Norte, con dos haplotipos entre México y Guatemala; Central, con un haplotipo entre Honduras, Nicaragua y Noroeste de Costa Rica; Sur, con dos haplotipos entre el resto de Costa Rica y Panamá (Figura 2).

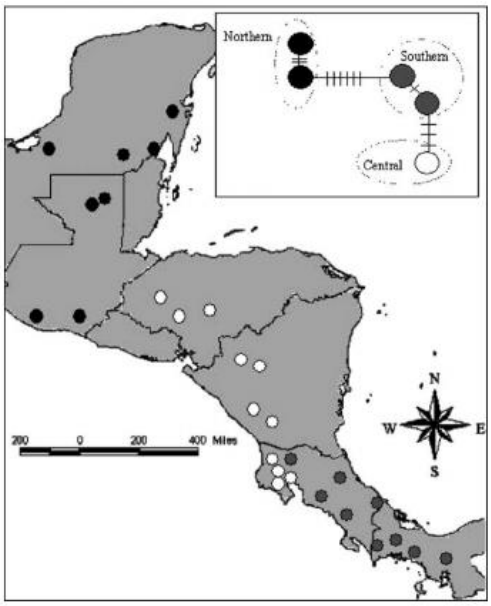


Figura 2. Distribución de la variación de ADN cloroplástico en poblaciones de *C. odorata* para Mesoamérica. Círculos negros: haplotipos para México y Guatemala; círculos blancos: haplotipos para Honduras, Nicaragua y noroeste de Costa Rica; círculos grises: haplotipos para el resto de Costa Rica y Panamá (Cavers *et al*. 2004).

En otro estudio realizado en Centro y Suramérica se utilizaron ribosomas nucleares y diferentes regiones de plásmidos para el estudio del género *Cedrela*. Se lograron identificar cuatro nuevas especies y comprobaron que para *C. odorata* hay poblaciones con preferencias a diferentes tipos de hábitats y distintos rasgos morfológicos, las cuales en un futuro podrían conducir a una mayor especiación de las poblaciones. Las cuatro nuevas especies identificadas se encuentran: una en las laderas Amazónicas desde los Andes de Colombia hasta Perú, otra en el Pacífico noroeste de Perú, una tercera al norte de Perú y una cuarta en el Pacífico norte de El Salvador (Muellner *et al*. 2009).

La diversidad genética de *C. odorata* en Nicaragua ha sido poco estudiada; no obstante, Tijerino *et al*. (2016), utilizaron marcadores RAPD en cinco poblaciones del pacífico nicaragüense y lograron identificar promedios de Ho=0,524 y He=0,347 y riqueza alélica promedio de 2,0 para poblaciones con una diferenciación genética moderada (FST=0,13) separadas por poco más de 60 km.

1.5.5. Marcadores moleculares

Un marcador genético o molecular es una sección de ADN con una ubicación física identificable en un cromosoma y cuya herencia puede ser rastreada; un marcador puede ser un gen o una sección de ADN (Cornejo *et al*. 2014). Los marcadores moleculares permiten identificar variaciones en el ADN de los individuos de una población (polimorfismo) y son ampliamente utilizados en la identificación y caracterización de la genética humana, vegetal, animal y microbiana. Para que un carácter se considere como marcador para flujo genético y deriva genética debe ser altamente polimórfico, insensible a los efectos ambientales, ser codominante, de rápida identificación y de análisis simple (Picca *et al.* 2004).

Se pueden utilizar rasgos morfológicos para caracterizar la variación poblacional (Azofeifa-Delgado 2006). Variables como la altura del árbol, diámetro del tallo, forma del tallo, cantidad de raíces secundarias, tiempos de germinación, entre otros, pueden ser utilizados como marcadores morfológicos (Picca *et al.* 2004), Sin embargo, estos poseen un bajo nivel de polimorfismo, son afectados por el ambiente y muchos se expresan únicamente en plantas adultas.

Los marcadores moleculares, por otra parte, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de un organismo, ser aplicables a cualquier tipo de material vegetal, independientes de la época del año y libres de efectos epistáticos, entre otros. Su principal limitante está relacionada con el alto costo de los análisis (Hillis 1987, Phillips-Mora *et al.* 1995).

Existen dos tipos de marcadores moleculares: las proteínas y los marcadores de ADN. Las proteínas, principalmente isoenzimas o aloenzimas, consisten en diferentes formas moleculares de una misma enzima que actúan sobre un sustrato en común, pero con diferente actividad electroforética; tienen como principal ventaja el bajo costo de utilización y como principales desventajas el bajo nivel de polimorfismo y la baja reproducibilidad de resultados (Phillips-Mora *et al*. 1995, Picca *et al*. 2004, Loo 2011).

Por otra parte, existen diferentes tipos de marcadores de ADN. Seguidamente se describen los cinco más utilizados en la actualidad.

- Amplificación aleatoria de ADN polimerasa (RAPD), son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN; son altamente polimórficos, no requiere pruebas radioactivas y amplifican secciones codificantes y no codificantes del ADN; su principal desventaja es ser dominantes y poseer poca detección de alelos raros (Williams *et al* 1990, Alcántara 2014).
- Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), es una técnica que combina la utilización de dos enzimas de restricción en conjunto con análisis PCR, pero es más complicada que el RAPD y SSR (Azofeifa-Delgado 2006).
- Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP), son marcadores codominantes que consisten en secuencias específicas de bases nitrogenadas que varían de longitud como producto de endonucleasas de restricción específicas, pero tienen como desventaja la alta complejidad técnica, su difícil automatización, altos costos y el uso de radioisótopos de vida corta. (Phillips-Mora *et al* 1995, Valadez 2000, Picca *et al*. 2004).
- Polimorfismo de nucleótidos simples (SNP), es un sitio polimórfico donde las variantes difieren por la eliminación, inserción o sustitución de un solo nucleótido (Picca *et al.* 2004, Loo 2011).
- Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), son secuencias de una a seis pares de bases repetidas en el ADN. Como principal ventaja tienen el generar una gran cantidad de información, alta sensibilidad, alto grado de polimorfismo, son codominantes; su principal desventaja es el alto costo económico para generar los iniciadores, ser específicos para grupos de especies y las propiedades estadísticas no se comprenden en su totalidad (Phillips-Mora *et al*. 1995, Loo 2011, Zane *et al.* 2002, Powell *et al.* 1996).

Las secuencias de los microsatélites se pueden encontrar en regiones codificantes y no codificantes del ADN, son altamente variables y, por tanto, son útiles para medir similitudes inter o intraespecíficas. Las secuencias microsatélites varían entre las especies, en mamíferos las repeticiones más comunes son (GT)n y en los vegetales (AA)n y (AT)n (Philliph-Mora *et al.* 1995).

Los microsatélites pueden ser mononucleótidos, dinucleótidos, trinucleótidos, hasta hexanucleótidos; además pueden estar compuestos por un motivo único, considerándose puros (AAAAAAAAAAA o $(A)_{11}$ o pueden ser interrumpidos AAAAAAGAAAAAA o $(A)_6G(A)_6$.

Hernández *et al*. (2008), desarrolló un conjunto de 26 marcadores microsatélites optimizados para PCR y seleccionados por ser altamente polimórficos, pero solo 9 fueron utilizados para estimar la diversidad genética de poblaciones de semillas de Mesoamérica. En esta investigación se utilizaron 10 de estos marcadores; en el Cuadro 1 se presentan sus principales características.

Cuadro 1. Caracterización de 10 marcadores SSR utilizados para el análisis de diversidad genética de *Cedrela odorata* (Hernández *et al*. 2008)

Locus	Motivo	Secuencia del primer 5'-3'	Tamaño (pb)	T (ºC)	No. de accesión GenBank
Ced2	(GA)20	F:TTTGCTTTGAGAAACCTTGT	130-170	59	EF413962
		R:AACTTTCGAATTGGTTAAGG			
Ced4		F:CTCTGTGTTAAACCCGAATC	200-220	57	No
		R:GAATAAATCGAAACGCACTC			
Ced18	(GA)23	F:CAAAGACCAAGATTTGATGC	130-150	57	EF413963
		R:ACTATGGGTGGCACAACTAC			
Ced22		F:CTTCGCCTTGGCCTTTCTAC	120-140	59	No
		R:CGGAGGAGATCGCAGTTTAT			
Ced41	(TC)18	F:TCATTCTTGGATCCTGCTAT	120-160	57	EF413964
		R:GTGGGAAAGATTGTGAAGAA			
Ced44	(TG)14(AG)17	F:ACTCCATTAACTGCCATGAA	180-240	53	EF413965
		R:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC			
Ced54	(GA)15(AG)6G(GA)5	F:GATCTCACCCACTTGAAAAA	180-230	59	EF413966
		R:GCTCATATTTGAGAGGCATT			
Ced65	(GA)7(CA)14	F:GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC	160-200	59	EF413968
		R:GAGGTTCGATCAGGTCTTGG			
Ced95	(CT)17(AC)13	F:ATTTTCATTCCCTTTTAGCC	190-250	53	EF413969
		R:TTATCATCTCCCTCACTCCA			
Ced131	(CT)16	F:CTCGTAATAATCCCATTCCA	80-120	53	EF413970
		R:GGAGATATTTTTGGGGTTTT			

T (ºC): Temperatura de annealing; valores de temperatura modificados para esta investigación

1.6. Resultados

En toda la población se encontró un total de 189 alelos, con un nivel promedio de riqueza alélica A=18,90; además de niveles de heterocigosidad esperada (He) de 0,76 ± 0,01 y promedios de heterocigosidad observada (Ho) de 0,40 ± 0,04.

El análisis de diferenciación genética para la categoría uso de suelo mostró diferencias genéticas pequeñas, F_{ST} de 0,026 (P=0,001). Mientras que el análisis para la fenología mostró un F_{ST} levemente mayor (0,052, P=0,001), siendo el estado vegetativo mayor en riqueza alélica al estado reproductivo (14,74 y 13,47 respectivamente). Sin embargo, estas diferencias genéticas son muy bajas, por lo que no se considera que el uso del suelo ni el estado fenológico influyen en la generación de una divergencia poblacional.

Los árboles con DAP mayor a 60 cm también fueron un poco más diversos (promedios de 15,15 alelos por locus), que los árboles con diámetros menores a 60 cm (promedios de 14,11 alelos por locus), con F_{ST} de 0,03 y p=0,001. La procedencia también presentó niveles similares de diferenciación genética, siendo los árboles de regeneración natural ligeramente más diversos que los árboles plantados (12,9 y 12,59 alelos por locus respectivamente).

El programa *Structure* calculó como número más probable, una cantidad de 3 subpoblaciones interactuando en el área de estudio ($\Delta K=3$), las cuales para efectos de esta investigación se denominaron subpoblación A, B y C. El análisis de diferenciación genética para las subpoblaciones mostró un valor de $F_{ST}=0,30$; P=0,001.

La prueba T mostró diferencias significativas entre los promedios de diversidad genética (He) para la subpoblación C y las subpoblaciones A y B. La subpoblación C presenta los más bajos niveles de diversidad genética (0,372 ± 0,078), mientras que las subpoblaciones A y B, promedios mayores a los 0,6 alelos por locus.

La caracterización de cada subpoblación mostró que no existían diferencias en cuanto al uso de suelo y a la procedencia de los individuos; sin embargo, el estado fenológico mostró tendencias similares a la variabilidad genética de las subpoblaciones, donde A y B presentaron una cantidad casi 50/50 de individuos reproductivos y vegetativos, mientras que la subpoblación C presentó más de un 80% de individuos en estado reproductivo.

El ANOVA realizado al DAP de los árboles de cedro de cada subpoblación mostró diferencias significativas (F=15,24; gl=2; P<0,0001; α=0,01); el DAP de la subpoblación B fue estadísticamente mayor que el de A y C. La altura de los árboles para cada subpoblación indicó diferencias significativas (F=13,18; gl=2; P<0,0001; α=0,01) para las tres subpoblaciones; los árboles de la subpoblación B fueron más altos que los de A y C.

La variable ambiental que se comportó más acorde con los resultados genéticos fue la altitud. Mediante el ANOVA se detectaron diferencias significativas (F=5,02; gl=2; P=0,0077; α=0,01) y con la prueba LSD de Fisher se observó que la subpoblación C se ubica a una menor altitud que la subpoblación A y B.

1.7. Conclusiones

El nivel de heterocigosidad esperada casi duplicó el nivel de heterocigosidad observada, lo que puede indicar una deficiencia de individuos heterocigotos en la población de cedro.

Se encontró una divergencia genética alta a pesar de ser un área con una extensión territorial muy pequeña (50 000 ha). La explicación a la estructura encontrada es de difícil

respuesta con los datos recolectados en este estudio, así que se sugiere más investigación al respecto.

Se identificaron tres subpoblaciones con diferentes niveles de diversidad genética, siendo las subpoblaciones A y B significativamente más diversas que la subpoblación C.

Las variables fenotípicas y ambientales que presentaron una tendencia similar a los rasgos genéticos fueron la fenología y la altitud. La subpoblación C tiene una mayor cantidad de individuos en estado reproductivo, se ubica significativamente a una menor altitud y presenta los niveles de diversidad genética menores. Las subpoblaciones A y B poseen una cantidad casi 50/50 de individuos reproductivos y vegetativos, se encuentran significativamente a una mayor altitud y poseen los niveles más altos en diversidad genética.

La recolección de semillas para procesos de restauración debe considerar la estructura genética poblacional para evitar la introducción de material con baja diversidad genética y con altos niveles de homocigosidad que podrían poner en riesgo la sostenibilidad de las poblaciones de cedro en el paisaje centinela. Sin embargo, es necesario el desarrollo de más investigaciones que ayuden a explicar qué factores han causado la estructura genética poblacional y que ayuden a comprender las relaciones entre las variables fenológicas y la estructura genética de la población de *C. odorata* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

1.8. Literatura citada

Alcántara, MR. 2014. Breve revisión de los marcadores moleculares. *In* Cornejo R, A; Serrato D, A; Rendón A, B; Rocha M, G (eds.). Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. México, D.F., México, INECC-SEMARNAT. p. 541-566.

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.

Amores C, FM. 2015. Contribución de los árboles en finca a los medios de vida de familias rurales en dos sitios contrastantes de Nicaragua. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 89 p.

Armenteras, D; González, TM; Luque-Moreno, F; Rodríguez, N; Argotty, F; Bonfil, C; Espinosa, C; Luis Machín, J; Rejalaga Noguera, L; Ruiz Gómez, V; Guzmán, E; Herrera, A; Funes, I; Jara, A; Ramón, P; Savé, R; Retana, J; Espelta, J. 2015. IBERO REDD+: Red de CYTED para el monitoreo del estado de la conservación y recuperación de bosques húmedos y secos

en Latinoamérica en el contexto de la deforestación evitada: síntesis de avances en la implementación de REDD+ en los países participantes. s. l., Red IBERO-REDD+. 52 p.

Azofeifa-Delgado, Á. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. Agronomía Mesoamericana 17(2):221-242.

Azpilicueta, M; Gallo, L; Pastorino, M; Lozano, L. 2011. Aspectos genéticos de la restauración ecológica del bosque nativo. Ejemplos de aplicación en la región Andino-Patagónica. Bariloche, Argentina, INTA. 8 p. (Serie Técnica Sistemas Forestales Integrados, Cuadernillo no. 2).

Baucom, RS; Estill, JC; Cruzan, MB. 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

Boshier, D. 2011. *Leucaena salvadorensis*: Variación genética y conservación: Estudio de caso y notas para el profesor. *In* Boshier, D; Bozzano, M; Loo, J; Rudebjer, P (eds.). Manual de formación en recursos genéticos forestales (en línea). Roma, Italia, Biodiversity International. p. 978-992. Consultado: 26 nov. 2016. Disponible en: http://forest-genetic-resources-training-guide.bioversityinternational.org/

Boshier, D; Gordon, JE; Barrance, AJ. 2004. Prospects for *circa situm* tree conservation in Mesoamerican dry forest agro-ecosystems. *In* Frankie, G; Mata, A; Vinson, S (eds.). Biodiversity Conservation in Costa Rica: Learning the Lessons in the Seasonal Dry Forest. Berkeley, United States of America, University of California Press. p. 210-226.

Cabrero, J; Camacho, JPM. 2002. Fundamentos de genética de poblaciones. *In* Soler, M (ed.). Evolución: la base de la biología. España, Proyecto Sur. p. 83-126.

Cavers, S; Navarro, C; Lowe, AJ. 2003. 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, AJ. 2004. Targeting genetic resource conservation in widespread species: a case study of *Cedrela odorata* L. Forest Ecology and Management 197:285-294.

CBD (Convenio sobre la Diversidad Biológica). 2010. Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020. Quebec, Canadá, Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2 p.

Céspedes, M; Gutiérrez, MV; Holbrook, NM; Rocha, OJ. 2003. Restoration of genetic diversity in the dry forest tree *Swietenia macrophylla* (Meliaceae) after pasture abandonment in Costa Rica. Molecular Ecology 12:3201-3212. doi 10.1046/j.1365-294X.2003.01986.x

Cintrón, BB. 2000. *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. *In* Francis, J; Lowe, C (eds.). Trabanino, S (trad.). Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales. Río Piedras, Puerto Rico, Instituto Internacional de Dasonomía Tropical. p. 128-134.

CITES, (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora). 2018. Checklist of CITES Species: *Cedrela odorata* (en línea). Consultado 15 ene. 2018. Disponible en http://checklist.cites.org/#/en/search/output_layout=alphabetical&level_of_listing=0&show_synonyms=1&show_author=1&show_english=1&show_spanish=1&show_french=1&scientific_name=Cedrela+odorata&page=1&per_page=20

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* Cordero, J; Boshier, D (eds.). Árboles de Centroamérica: Un manual para extensionistas. s. l., OFI/CATIE. p. 447-452.

Cornejo, RA; Serrato, DA; Rendón A, B; Rocha M, G (eds). 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos. México, D.F, México, Inecc-Semarnat. 274 p.

Curtis, H; Barnes, N; Schnek, A; Massarini, A. 2006. Invitación a la Biología. 6ª ed. Buenos Aires, Argentina, Editorial Médica Panamericana. 728 p.

Davies, SJ; Cavers, S; Finegan, B; White, A; Breed, MF; Lowe, AJ. 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, JP. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. Forest Ecology and Management 255:334-339.

Eguiarte, LE; Aguirre-Planter, E; Scheinvar, E; González G, A; Souza, V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. México, UNAM. 30 p.

Ellstrand, NC; Elam, DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics 24:217-242.

Esquivel, MJ; Harvey, CA; Finegan, B; Casanoves, F; Skarpe, C; Nieuwenhuyse, A. 2009. Regeneración natural de árboles y arbustos en potreros activos de Nicaragua. Agroforestería en las Américas 47:76-84.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2015. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2015: ¿Cómo están cambiando los bosques del mundo? Roma, Italia. 56 p.

Frankham, R; Ballou, JD; Briscoe, DA. 2004. A primer of conservation genetics. Nueva York, United States of America, Cambridge University Press. 236 p.

Gallo, LA; 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

Griffiths, AJF; Miller, JH; Suzuki, D; Lewontin, RC; Gelbart, WM. 2000. Genética. 7ª ed. Madrid, España, McGraw-Hill - Interamericana. 849 p.

Hanson, TR; Brunsfeld, SJ; Finegan, B; Waits, LP. 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, GG; Navarro, C; Cavers, S. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. Conservation Genetics 9(2):457-459. doi 10.1007/s10592-007-9334-y

Hillis, DM. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18:23-42.

Holdridge, LR. 1976. Taxonomía de las Meliaceas Latinoamericanas. *In* Whitmore, J (ed.). Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller) Lep. Pyralidae. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 5-7.

Hughes, AR; Inouye, BD; Johnson, MTJ; Underwood, N; Vellend, M. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. Ecology Letters 11:609-623. doi 10.1111/j.1461-0248.2008.01179.x

Inafor (Instituto Nacional Forestal, Nicaragua). 2009. Resultados del inventario nacional forestal: Nicaragua, 2007-2008. León Lau Williams, W (ed.) Managua, Nicaragua. 232 p.

Lander, TA; Boshier, DH; Harris, SA. 2010. Fragmented but not isolated: contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. Biological Conservation (11):2583-2590. doi 10.1016/j.biocon.2010.06.028

Ledig, FT. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. Oikos 63(1):87-108.

Loo, JA. 2011. Manual de genética de la conservación: Principios aplicados de genética para la conservación de la diversidad biológica. México, DF, México, Conafor. 196 p.

Marena (Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales de Nicaragua). 2016. Proyecto de apoyo a la preparación de la estrategia para la reducción de emisiones por deforestación y degradación forestal. Nicaragua. 49 p.

Marena (Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales de Nicaragua) /Inafor (Instituto Nacional Forestal, Nicaragua). 2002. Guía de especies forestales de Nicaragua. Managua, Nicaragua, Editora de Arte, S.A. 304 p.

Muellner, AN; Pennington, TD; Chase, MW. 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; Vásquez, W. 1986. Variabilidad genética en semillas y plántulas de *Cedrela odorata*. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 13 p.

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.

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; Cavers, S; Pappinen, A; Tigerstedt, P; Lowe, A; Merilä, J. 2005. Contrasting quantitative traits and neutral genetic markers for genetic resource assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. Silvae Genetica 54-6:281-292. doi 10.1515/sg-2005-0041

NHSL (Nicaragua-Honduras Sentinel Landscape). 2016. Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras (en línea). Consultado 20 oct. 2016. Disponible en https://paisajecentinela.org/NicaraguaHonduras/el-paisaje-centinela-nicaragua-honduras/descripcion/

Nora, S; Albaladejo, RG; González Martínez, SC; Robledo-Arnuncio, 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

Orozco A, L; López Sampson, A. 2013. Evolución, aplicación y futuro de la agroforestería en Nicaragua. Agroforestería en las Américas 49:99-110.

Patiño V, F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas (en línea). Roma, Italia, FAO. Consultado 30 nov. 2016. Disponible en http://www.fao.org/docrep/006/AD111S/AD111S00.HTM

Pavón T, J; Sequeira, A; Gutiérrez, C; Harvey, C; Menocal, OA. 2003. Plantaciones forestales de Nicaragua (en línea). Obregón, H (ed.). Nicaragua, INTA. 50 p. (Guía tecnológica No. 26). Consultado 14 nov. 2017. Disponible en http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/manejoforestal%202014.pdf

Peakall, R; Smouse, PE. 2015. Appendix 1–Methods and Statistics in GenAlEx 6.1. Canberra, Australia, The Australian National University. 26 p.

Pérez C, O. 2011. Estudio de mercado de *Cedrela odorata* en Bolivia, Brasil y Perú (en línea). Organización Internacional de Maderas Tropicales. Consultado 30 set. 2017. Disponible en http://www.itto.int/files/user/cites/peru/Estudio%20de%20Mercado%20Cedro%20%20Final%20OP.pdf

Phillips-Mora, W; Rodríguez R, H; Fritz, PJ. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones de cacao, *Theobroma cacao* (en línea). Turrialba, Costa Rica, CATIE. 173 p. (Informe Técnico No. 252). Consultado 26 nov. 2017. Disponible en http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4119e/A4119e.pdf

Picca, A; Helguera, M; Salomón, N; Carrera, A. 2004. Capítulo 4. Marcadores moleculares. *In* Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L (eds.). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argentina, Ediciones INTA. p. 61-68.

Powell, W; Morgante, M; Andre, C; Hanafey, M; Vogel, J; Tingey, S; Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2(3):225-238. doi 10.1007/BF00564200

Rich, SS; Bell, AE; Wilson, SP. 1979. Genetic drift in small populations of *Tribolium*. Evolution 33(2):579-584.

Rivas A, CA. 2004. Idea de proyecto: Establecimiento de plantaciones forestales comerciales en los departamentos de Chinandega y Matagalpa, Nicaragua. Managua, Nicaragua, IICA. 43 p.

Rojas-Rodríguez, F; Torres-Córdoba, G. 2013. Árboles del Valle Central de Costa Rica: reproducción cedro amargo (*Cedrela odorata* L.). Revista Forestal Mesoamericana Kurú (Nota técnica) 11(26):25-27.

Salazar, R; Soihet, C; Méndez, JM. 2000. Manejo de semillas de 100 especies forestales de América Latina. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 47-48. (Serie técnica. Manual Técnico no. 41).

Sánchez, D; López, M; Medina, A; Gómez, R; Harvey, C; Vílchez, S; Hernández, B; López, F; Joya, M; Sinclair, FL; Kunth, S. 2004. Importancia ecológica y socioeconómica de la cobertura arbórea en un paisaje fragmentado de bosque seco de Belén, Rivas, Nicaragua. Encuentro 68:7-22.

Templeton, AR; Shaw, K; Routman, E; Davis, S. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. Annals of the Missouri Botanical Garden 77(1):13-27. doi 10.2307/2399621

Thomas, E; Jalonen, R; Loo, J; Boshier, D; Gallo, L; Cavers, S; Bordács, S; Smith, P; Bozzano, M. 2014. Genetic considerations in ecosystem restoration using native tree species. Forest Ecology and Management 333:66-75S. doi 10.1016/j.foreco.2014.07.015

Tijerino, A; Callejas, L; Cerda-Granados, DA. 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

Valadez M, EK. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas: (Teoría y Protocolos de Laboratorio). 5ª ed. México, Ediciones Mundi-Prensa. 148 p.

White, GM; Boshier, DH; Powell, W. 1999. Genetic variation within a fragmented population of *Swietenia humilis* Zucc. Molecular Ecology 8:1899-1909.

White, GM; Boshier, DH; Powell, W. 2002. Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. Proceedings of the National Academy of Sciences 99(4):2038-2042.

Wilcove, DS; McLellan, CH; Dobson, AP. 1986. Habitat fragmentation in the temperate zone. *In* Soulé, ME (ed.). Conservation Biology. Massachusetts, United States of America, Sinauer Associates, Inc. p. 237-256.

Williams, JG; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; Tingey, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research 18(22):6531-6535. doi 10.1093/nar/18.22.6531

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. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 314 p. (Serie Técnica. Manual técnico no. 43).

Zane, L; Bargelloni, L; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: A review. Molecular Ecology 11:1-16. doi 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x

2. Artículo: Diversidad genética de C*edrela odorata* L. en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras y sus implicaciones para la restauración forestal

Palacios C.[1] | van Zonneveld M.[2] | Kalousová M.[3] | Finegan B.[1] | Somarriba E.[1] | Lojka B.[3]

[1] *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica.*
[2] *World Vegetable Center, Shanhua, Taiwan.*
[3] *Czech University of Life Sciences Prague, República Checa.*

2.1. Resumen

Cedrela odorata es una especie maderable de alto valor comercial. Debido a la sobreexplotación y a la deforestación de los bosques tropicales, las poblaciones de esta especie están siendo reducidas y aisladas dentro de un paisaje cada vez más fragmentado. En esta investigación se estudió la diversidad genética para reconocer sitios con alta diversidad genética que sirvan como fuentes de germoplasma para restaurar la conectividad de la especie en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. En la investigación se estudió una matriz agropecuaria de aproximadamente 50 000 ha, en la cual se recolectaron 164 muestras de cambium vascular de la especie *Cedrela odorata* y se tomaron como criterios de clasificación: el uso de suelo, estado fenológico, DAP y procedencia. A pesar de lo pequeño del área de estudio el AMOVA realizado indicó una estructura genética con diferencias significativas entre las subpoblaciones (F_{ST}=0,30 y P=0,001); las subpoblaciones denominadas A y B son de mayor riqueza y diversidad genética que la subpoblación denominada C. Cada población fue caracterizada con el uso de variables fenotípicas y ambientales, determinándose que el estado fenológico y la altitud de cada subpoblación tienen tendencias similares a los valores genéticos de cada grupo. No obstante, las subpoblaciones A y B pueden ser consideradas como potenciales fuentes de germoplasma, si se comprenden adecuadamente las causas de la estructura genética y cómo las variables altitud y estado fenológico se correlacionan.

Palabras clave: Genética de especies tropicales; microsatélites, restauración forestal; diferenciación genética en pequeñas poblaciones, conservación *circa situm*.

2.2. Introducción

Los bosques son una fuente importante de la diversidad genética de las especies; sin embargo, la contaminación, degradación y fragmentación de los ecosistemas dividen las poblaciones en pequeños parches de bosques con tamaños poblacionales pequeños. La influencia de dicha fragmentación poblacional se manifiesta con el aumento de la endogamia,

la interrupción del flujo genético, el aumento en la erosión genética y manifestaciones más intensas de la deriva genética aleatoria (Ledig 1992, Bawa y Dayanandan 1998).

Como producto de estos procesos de reducción poblacional se tiene una alteración de los patrones de diversidad genética y estructura genética (Templeton *et al*. 1990, Ledig 1992, Baucom *et al*. 2005, Hanson *et al*. 2008, Davies *et al*. 2013). Las poblaciones con pequeños tamaños poblacionales tienden a presentar un elevado cruzamiento endogámico, por lo que la reducción en los niveles de heterocigosidad son más intensos que en poblaciones grandes; de igual forma, la estructura genética manifiesta una mayor divergencia en pequeñas poblaciones (Ellstrand y Elam 1993, Cordero *et al*. 2003, Frankham *et al*. 2004).

Cedrela odorata es una especie maderable que ha sido sobreexplotada selectivamente, lo que ha provocado una reducción de sus poblaciones y ha hecho de esta una especie amenazada (Patiño 1997, Cintrón 2000, Marena e Inafor 2002, Cordero *et al.* 2003). El impacto de la sobreexplotación se observa en la poca presencia de árboles de cedro en los bosques naturales, encontrándose más comúnmente asociada con sistemas agroforestales como plantaciones de café o formando parte de patios y potreros (Patiño 1997, Navarro *et al.* 2004, Esquivel *et al*. 2009, Almendarez *et al*. 2013, Amores 2015).

Diferentes investigadores han indagado la variabilidad genética de *C. odorata* en Mesoamérica, Destacan los estudios de Cavers *et al*. (2003), con marcadores AFLP quienes identificaron tres linajes de la especie para Mesoamérica; Navarro *et al* (2002), estudió rasgos morfológicos para poblaciones de *C. odorata* en Costa Rica y Muellner *et al*. (2009), quienes identificaron cuatro nuevas especies para el género *Cedrela*, una gran variabilidad fenotípica y una amplia preferencia de hábitats.

La erosión genética y depresión endogámica en poblaciones pequeñas y aisladas pueden ser contrarrestadas con el desarrollo de adecuadas estrategias de conservación y restauración. Para especies amenazadas como *C. odorata* cuyas poblaciones se encuentran en su mayoría fuera del boque natural y dentro de sectores productivos, es ideal un tipo de conservación basado en productores (Conservación *Circa situm*) (Gallo *et al*. 2009, Boshier *et al.* 2004).

La información genética sobre especies amenazadas como *C. odorata*, además de proveer de herramientas para la toma de decisión en cuanto a estrategias de conservación y restauración (Gallo *et al*. 2009), ayuda a cumplir con la meta 13 del objetivo estratégico C de las metas de Aichi, que trata sobre la reducción de la erosión genética y la conservación de la diversidad genética de las especies cultivadas y silvestres (CBD 2010), y con el cumplimiento de estrategias de restauración relacionadas con el Desafío de Bonn y la iniciativa 20x20.

En un contexto local, Nicaragua presenta altos niveles de deforestación. Se estima que para el 2008 tenía un 25% de su territorio cubierto por bosque natural; esto ha generado un

mayor interés en la creación de estrategias de restauración forestal, en especial para especies de interés económico. Es así como para el 2008, la mayoría de los finqueros encuestados por Inafor (2009), mencionaban a *C. odorata* como la principal especie maderable de interés para reforestar sus fincas.

La información necesaria para la selección de germoplasma para el desarrollo de proyectos de restauración debe incluir el conocimiento genético del recurso (Gallo *et al*. 2009), además del tipo y calidad de las semillas o plántulas a utilizar. Semillas con baja diversidad genética son un problema generalizado en los proyectos de restauración, en especial los vinculados con la reforestación de poblaciones para reducción de vulnerabilidad al cambio climático; por tanto, es ideal conocer los sitios adecuados de recolección de semillas de alta diversidad genética y así completar satisfactoriamente los objetivos de restauración (Jalonen *et al*. 2017).

Los marcadores microsatélites utilizados en la presente investigación fueron desarrollaron por Hernández *et al.* (2008), quienes en colecciones de cedro de distintas procedencias obtuvieron riquezas alélicas de 14 a 30 alelos por locus y niveles de heterocigosidad observada entre 0,61 y 0,88.

La presente investigación se desarrolló en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras (NHSL por sus siglas en inglés), con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre la diversidad genética y estructura genética de las poblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del NHSL y determinar las implicaciones de dicha diversidad genética para la restauración forestal. Se determinó cuál es la variación genética de la población de *C. odorata* en la matriz y se investigó cuáles factores ambientales y fenotípicos pueden ayudar a explicar la divergencia genética en la población de estudio.

2.3. Metodología

2.3.1. Área de estudio

Esta investigación se desarrolló en el NHSL, específicamente entre los municipios Tuma-La Dalia y Rancho Grande, entre las coordenadas geográficas 13°17'02.3", 13°13'02.7" latitud norte y 85°48'12.2”; 85°27'10.4" longitud oeste; en la región nor-central de Nicaragua y en las cercanías de la zona de amortiguamiento de la Reserva Natural Macizo Peñas Blancas (Reserva de Biosfera Bosawás) y Cerro Grande de Kuskawás.

En el área de estudio (Figura 3), se presentan características de zona tropical húmeda y premontano (Holdridge 1982), con precipitaciones anuales entre los 2000 y 2500 mm, las temperaturas promedio oscilan entre los 22ºC y 24ºC en las partes bajas y menos de 20ºC promedio en las partes más altas, pudiendo llegar hasta una mínima de 5ºC, en los días más

fríos. La altitud va desde los 341 m hasta los 1745 m en el costado oeste del Macizo Peñas Blancas y con pendientes desde 8% hasta más del 75% en las zonas más altas del Macizo (Fundenic s. f., Amores 2015).

2.3.2. Procedimientos metodológicos en campo

La investigación se realizó entre marzo y mayo del 2017, en un área aproximada de 50 000 ha. Se identificó un total de 728 árboles de cedro con un diámetro a la altura del pecho (DAP) >20 cm y mediante el software *Diva Gis* se logró aleatorizar un total de 164 árboles ubicados a una distancia mínima de 100 metros uno de otro para evitar individuos emparentados (Gillies *et al*. 1999). Los criterios de clasificación poblacional fueron el uso de suelo, estado fenológico, procedencia (nativo o plantado), DAP, altura del árbol y metros sobre el nivel del mar (msnm).

De cada árbol se obtuvieron dos muestras de cambium vascular con un sacabocados de 1 cm de diámetro como lo explica Colpaert *et al*. (2005). Las muestras fueron conservadas en 0,5 g de gel de Sílice de grado técnico, con tamaño de poro de 60 Å, 63-200 µm (Aldrich, USA), dentro de tubos Eppendorf de 1,5 ml.

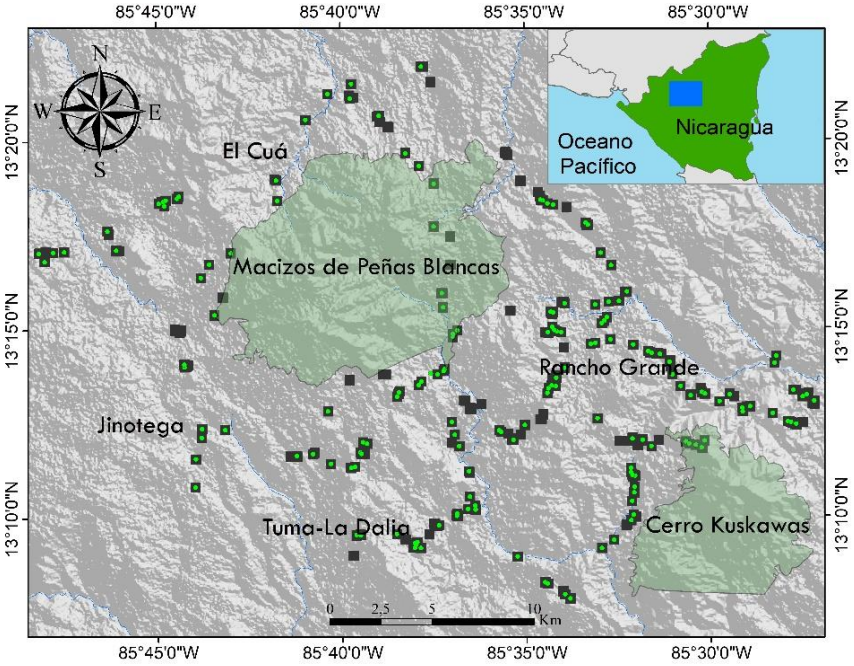


Figura 3. Matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras, Nicaragua. Gris: matriz agropecuaria, verde: áreas naturales protegidas; cuadros negros: ubicación de los 728 individuos identificados y puntos verdes: muestras seleccionadas.

2.3.3. Procedimientos metodológicos en laboratorio

- **Extracción de ADN**

De las 164 muestras analizadas se extrajo ADN en una concentración promedio de 258 ng/µl de agua grado PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). El protocolo consistió en la maceración de las muestras de cambium deshidratadas con 0,2 g de arena de mar esterilizada (tamaño de partícula de 0,1-0,5 mm). Posteriormente, el macerado se suspendió en 800 µl de solución tampón (CTAB: 2,8%; NaCl 1,3 M; EDTA 20 mM; TRIS 100 mM; PVP 1%; Mercaptoethanol 0,2%), se mezcló y se agregó 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y se incubó a 65°C por 60 minutos, se volvió a mezclar cada 10 min y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 700 µl de cloroformo: IAA (24:1) y se mezcló por 10 min, se centrifugó a 14000 RPM (4°C) por 10 minutos; se extrajo el sobrenadante y se mezcló por 5 min con 55 µl de CTAB 7%; se mezcló nuevamente con cloroformo y se repitió la centrifugación, para luego obtener otro sobrenadante que se mezcló con Isopropanol y se almacenó a 4°C por 12 horas. Luego se centrifugó y se eliminó el sobrenadante con dos lavados, el primero con 400 µl de EtOH al 96% y el segundo con 400 µl de EtOH al 70%. Se secó a temperatura ambiente y se agregaron 100 µl de agua grado PCR y 10 mg/ml de RNasa, se dejó disolver a 37°C. En Doyle (1987), modificado por Faleiro *et al*. (2002), se encuentra el protocolo más detallado.

- **Verificación de extracción**

Para visualizar la concentración de ADN extraída de cada muestra, se utilizó un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) y se procesaron las muestras en electroforesis al 0,8% en gel de agarosa con un tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) (1,0 M Tris- borato, 20mM EDTA, pH 8,3), conteniendo bromuro de etidio (0,5 mg/ml).

- **PCR**

Los microsatélites fueron amplificados con algunas modificaciones del protocolo seguido por Hernández *et al*. (2008); se utilizaron 10 µl que contenían 5 µl QIAGEN Multiplex PCR Master Mix (Qiagen, Germany), 3 µl H_2O, 0,5 µM Primer F, 0,5 µM primer R y 20 ng de ADN. Los grupos para el análisis múltiple fueron: multiplex 1 (ced2, ced22, ced65 y ced54); multiplex 2 (ced4, ced18, ced41) y multiplex 3 (ced44, ced95, ced131). Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), se realizaron en un termociclador T100 de BIO-RAD con el siguiente protocolo: 15 minutos a 95°C, 35 ciclos de 60 s a 95°C, 60 s a la temperatura indicada en el Cuadro 1 para cada cebador, 60s a 72°C, 10 minutos a 72°C y finalmente una temperatura de reposo de 4°C. Para la visualización de la correcta amplificación de los microsatélites se procesaron nuevamente las muestras en electroforesis con gel de agarosa.

- **Secuenciación**

Los resultados del PCR se separaron por electroforesis capilar en un secuenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EEUU); para la secuenciación se mezcló 1µl de producto PCR con 0,2 µl de GeneScan-500 LIZ (Applied Biosystems, EEUU) y 12 µl de Hi-Di formamida (Applied Biosystems, EEUU). El tamaño de los alelos se determinó con el programa GeneMarker versión 2.4.0 (SoftGenetics 2016). Un alelo de microsatélite se trató como dato faltante después de tres fallas de amplificación.

2.3.4. Definición de grupos genéticos

Se realizaron diferentes pruebas para determinar la diversidad y estructura genética de la población de *C. odorata*, como se muestra a continuación.

El primer método consistió en clasificar los individuos de las poblaciones según rasgos fenotípicos y ambientales:

- Uso de suelo: bosques, frutales, cacaotales, cercas, patios, tacotales, potreros y cafetal.
- Fenología: se determinaron dos clases de estado: reproductivos (árboles en estado de floración o fructificación) y vegetativos (árboles sin estructuras reproductoras presentes).
- Procedencia: se clasificó la población de acuerdo con el conocimiento de los productores: árboles plantados o de regeneración natural (no plantados).
- DAP: se consideraron dos clases: árboles mayores a 60 cm y menores a 60 cm.

El segundo método consistió en la determinación de grupos genéticamente homogéneos mediante el programa *Structure* v.2.3 (Pritchard *et al*. 2000), utilizando únicamente los datos genéticos de la población (procedimiento explicado más adelante).

Posteriormente se caracterizó cada población de acuerdo con variables categóricas (uso de suelo, fenología y procedencia); variables cuantitativas fenotípicas (DAP y altura de los árboles) y ecogeográficas (altitud).

2.3.5. Análisis de diversidad genética

El análisis de diversidad genética se realizó con los programas informáticos InfoGen (Balzarini y Di Rienzo 2004) y HP-rare (Kalinowski 2004). Con InfoGen se calcularon la heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He) y el número efectivo de alelos por locus (NE), mientras que con HP-rare se calcularon por rarefacción la riqueza alélica y el número promedio de alelos privados (Kalinowski 2004). El índice de fijación (F) fue calculado con el programa GenAlex v.6.4. (Peakall y Smouse 2015).

El coeficiente de diferenciación genética entre subpoblaciones (F_{ST}) (Excoffier *et al*. 1992), fue calculado con GenAlex v.6.4. (Peakall y Smouse 20015), a través de un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) basado en 10 000 permutaciones, para evaluar la hipótesis nula de uniformidad genética entre pares de grupos.

Para la realización de inferencias sobre la estructura poblacional, se usó un análisis de asignación de individuos a grupos genéticamente homogéneos, sin tomar en cuenta ningún criterio de clasificación con el programa *Structure* v.2.3 (Pritchard *et al*. 2000). Este programa utiliza el método de Evanno (Evanno *et al*. 2005), y asigna a cada muestra la probabilidad de pertenecer a grupos similares, generando un valor del número más probable de subpoblaciones (K) en el área.

El protocolo aplicado en *Structure* fue: periodo de quemado de 10 000 repeticiones, después de esto un número de100 000 repeticiones de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC); se utilizó un modelo *Admixture* con frecuencias alélicas correlacionadas y se asumieron diferentes valores de F_{ST}. El ΔK más probable fue visualizado a través del programa en línea Structure Harvester (Earl 2012); la generación del análisis de clúster se realizó con el programa *Clumpp* 1.1.2. (Jakobsson *et al*. 2007). Finalmente, para la elaboración del gráfico de clúster para los diferentes K, se utilizó el programa *Distruct* 1.1. (Rosenberg 2004).

Las pruebas de hipótesis relacionadas a la diversidad genética (He), de las subpoblaciones se realizaron con el programa InfoGen (Balazrini y Di Rienzo 2004). Para ello se utilizó una T pareada para comparación de pares de medias con un nivel de significancia de 0,05.

Los análisis descriptivos y las gráficas de resultados fueron elaborados en Microsoft Excel 2016, mientras que el análisis de varianza (ANOVA) y el método de comparación múltiple LSD de Fisher aplicado a las variables cuantitativas (DAP, altura, altitud, coordenadas longitudinales y latitudinales), fue realizado en InfoStat (Di Rienzo *et al*. 2016) con un nivel de significancia de 0,01. El modelo ANOVA para cada variable fue el que se presenta a continuación.

$$Yij = \mu + Pi + \varepsilon ij$$

Donde:

μ: Media general

Pi: efecto de la iésima subpoblación

εij: error aleatorio, que se distribuye normal, independiente y con media cero.

Donde i: 1,2,3 (diferentes subpoblaciones encontradas por *Structure*).

2.4. Resultados

2.4.1. Diversidad genética de *C. odorata* según rasgos fenotípicos y ambientales

De los 728 árboles identificados se analizaron 164 y se obtuvieron 1640 electroferogramas de los cuales un 5% presentaron mala amplificación. La diversidad genética en general para la población presentó un total de 189 alelos diferentes distribuidos en los 10 loci estudiados y una riqueza alélica promedio de 18,90 alelos por locus (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis descriptivo de la diversidad genética de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras

Análisis	*N*	*Alelos totales*	*A*	*NE (±) SE*		*Ho (±) SE*		*He (±) SE*		*F (±) SE*	
Población	164	189	18,90	6,10	1,57	0,40	0,04	0,76	0,01	0,44	0,04

N: Número de árboles; A: riqueza alélica; NE: Número de alelos efectivos; Ho: media de heterocigosidad observada; He: media de heterocigosidad esperada; F: Índice de Fijación y SE: Error estándar.

El análisis de varianza molecular (AMOVA), tomando el uso de suelo como criterio de clasificación, mostró bajas diferencias entre las subpoblaciones (F_{ST}=0,026; P= 0,0001), lo que significa un 3% de divergencia genética entre los árboles ubicados en los diferentes usos de suelo, en contraste con las diferencias entre los individuos (39%) y dentro de cada individuo (58%) (Figura 4).

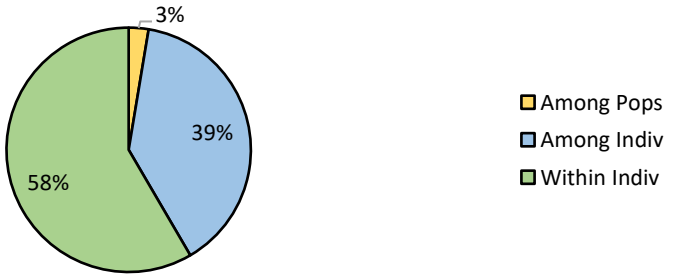


Figura 4. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras según el criterio uso de suelo. Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre los diferentes usos de suelo de la matriz; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos.

El análisis descriptivo del estado fenológico, las categorías por DAP y las procedencias de las muestras mostraron pequeñas variaciones entre cada una de las categorías para los niveles de riqueza alélica (12,59-15,15) y promedio de heterocigosidad esperada (0,69-0,79) (Cuadro 3).

El índice de fijación (F) para cada categoría presenta valores de endogamia más bajos para los árboles con un DAP mayor a 60 cm, mientras que los valores más altos corresponden a los árboles plantados (Cuadro 3).

Cuadro 3. Análisis descriptivo de la diversidad genética para el estado fenológico, procedencia y DAP de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras

Criterio	*Categoría*	*N*	*A*	*NE (±) SE*		*Ho (±) SE*		*He (±) SE*		*AP*	*F (±) SE*	
Fenológico	R	97	13,47	4,35	0,97	0,39	0,05	0,69	0,07	2,82	0,45	0,04
	V	67	14,74	7,78	1,27	0,47	0,06	0,79	0,08	4,08	0,38	0,05
Procedencia	Natural	112	12,90	5,12	0,96	0,44	0,05	0,73	0,07	3,78	0,39	0,04
	Plantados	52	12,59	5,60	0,76	0,39	0,06	0,76	0,07	3,48	0,50	0,06
DAP	<60 cm	81	14,11	4,44	0,86	0,36	0,05	0,70	0,07	4,26	0,49	0,04
	>60 cm	83	15,15	6,30	0,91	0,48	0,06	0,77	0,07	3,22	0,37	0,04

R: Individuos en estado reproductivo; V: individuos en estado vegetativo; Natural: árboles de regeneración natural; Plantados: árboles introducidos; N: tamaño de la muestra, A: riqueza alélica; NE: promedio de número efectivo de alelos por locus; Ho: media de heterocigosidad observada; **He**: media de heterocigosidad esperada; AP: Alelos privados; F: Índice de fijación y SE: Error estándar.

El AMOVA determinó que el estado fenológico de los individuos es la variable que más explica la diferenciación genética entre las diferentes agrupaciones realizadas, con un F_{ST} de 0,052, P=0,001; lo que se traduce en una diferenciación genética del 5% entre los árboles en estado reproductivo y vegetativo. Sin embargo, la principal fuente de variabilidad genética es la que existe dentro de cada uno de los individuos de la población (57%), seguido de la variabilidad dentro de cada subgrupo (38%) (Figura 5).

También se evidenció que los árboles clasificados por procedencia y DAP mostraron niveles similares de diferenciación genética entre subgrupos (F_{ST}=0,029, P=0,001), lo que significó un 3% de diferenciación genética entre árboles mayores y menores a 60 cm; así como un 3% de diferenciación genética entre los árboles plantados con respecto a los procedentes de regeneración natural. No obstante, la principal fuente de variación genética sigue siendo la variabilidad genética dentro de los individuos (58%) y en menor medida la variabilidad dentro de cada subgrupo (39%) (Figura 5).

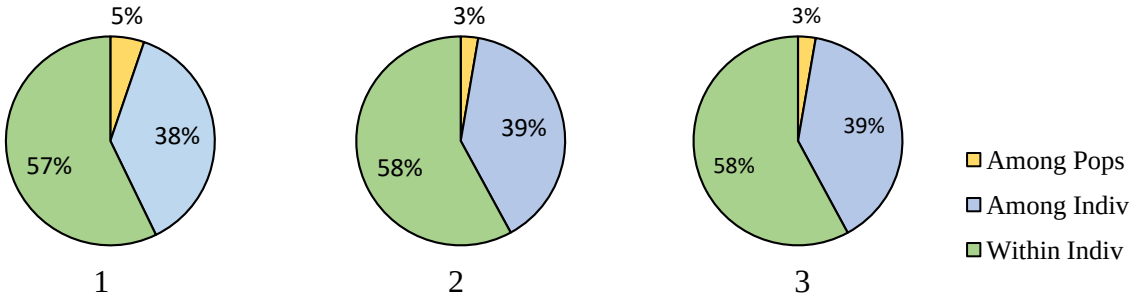


Figura 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) de la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras para los criterios 1) Estado fenológico (reproductivos y vegetativos); 2) Procedencia (regeneración natural y plantados) y 3) DAP (menores a 60 cm y mayores a 60 cm). Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre las diferentes categorías de cada criterio; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos.

2.4.2. Estructura genética poblacional

El programa *Structure* identificó una mayor probabilidad de existencia de tres subpoblaciones de árboles genéticamente homogéneos en la matriz agropecuaria. La Figura 6 muestra el ΔK más probable para la población en estudio.

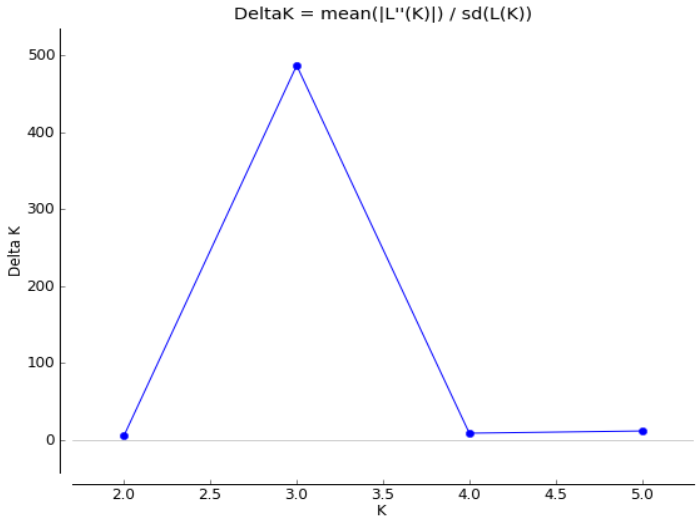


Figura 6. Identificación del ΔK más probable calculado por el programa *Structure* para la población de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

De acuerdo con el método de Evanno, en el NHSL se encuentran presentes tres subpoblaciones de *C. odorata* las cuales se denominaron "A, B y C". La subpoblación A contiene 67 individuos, la B 37 y la C 60 (Figura 7).

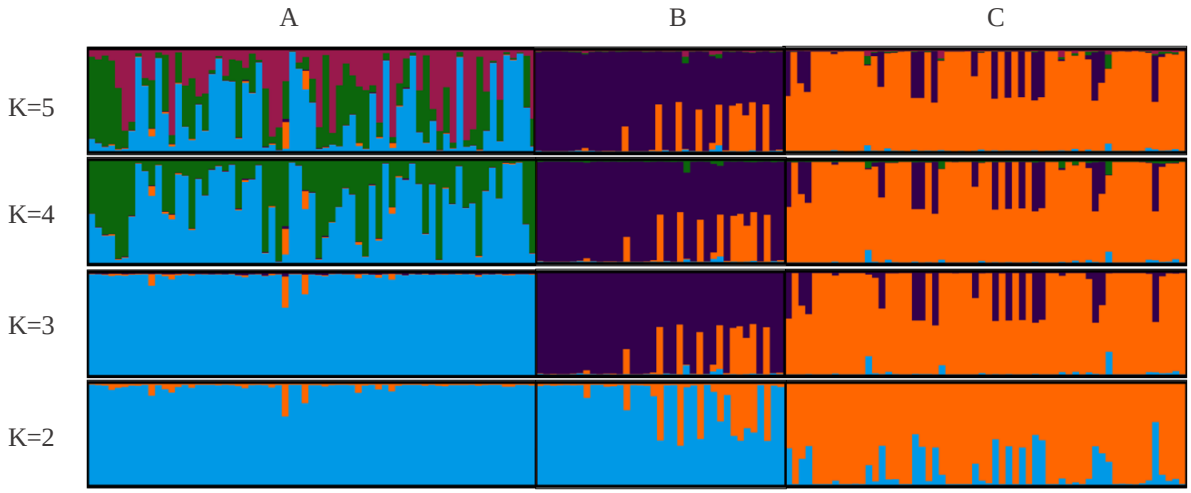


Figura 7. Asignación de probabilidades para las 164 muestras de *C. odorata* en cada grupo inferido por *Structure* para el número de poblaciones (K)=2-5. Cada muestra está representada por una línea vertical y su longitud indica la probabilidad de pertenecer a cada subpoblación; cada color en la gráfica representa una posible subpoblación.

El análisis de varianza molecular aplicado a las subpoblaciones identificadas por *Structure* (Figura 8), mostró una mayor diferencia genética dentro de cada individuo (52%); sin embargo, la diferencia genética entre subpoblaciones fue mayor a la diferencia genética entre individuos dentro de cada subpoblación (30% y 18% respectivamente). Con un F_{ST} de 0,30 y un P = 0,001 se determinó que existe una diferencia genética significativa entre las subpoblaciones en estudio (Figura 8 y Cuadro 4).

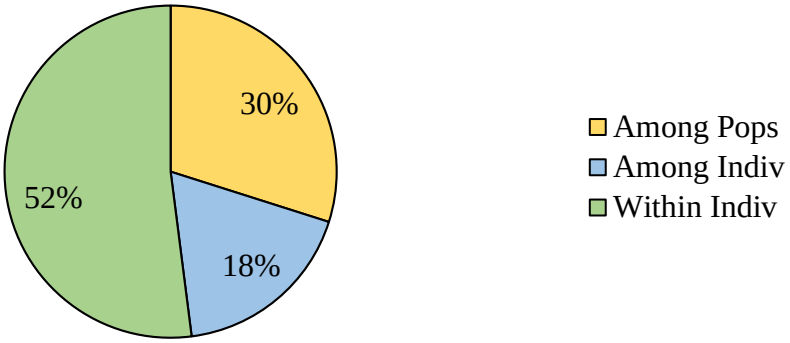


Figura 8. Representación gráfica del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para las tres subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Among Pops: diferencias genéticas de *C. odorata* entre las subpoblaciones; Among Indiv: diferencias genéticas entre los individuos; Within Indiv: variación genética dentro de los individuos.

Cuadro 4.Análisis de varianza molecular (AMOVA) para 10 marcadores microsatélites y 3 subpoblaciones de *C. odorata* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras

Fuente de variación	*g.l.*	*SS*	*Est. Var*	*%*	*P*
Entre subpoblaciones	2	274,919	1,258	30	0,0001
Entre individuos dentro de las subpoblaciones	161	597,461	0,761	18	
Dentro de los individuos	164	358,991	2,189	52	
Total	327	1231,372	4,208	100	

g.l.: Grados de libertad; SS: Suma de cuadrados; Est. Var: Varianza estimada; %: Porcentaje de variación; P: probabilidad de que un valor aleatorio sea mayor al valor observado

2.4.3. Diversidad genética de las subpoblaciones A, B y C

El análisis de diversidad genética presenta un mayor nivel de diversidad para las subpoblaciones A y B, con valores promedio de heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada de casi el doble que la subpoblación C. Sin embargo, con relación a los valores de riqueza alélica y alelos privados, la subpoblación A muestra valores superiores a las subpoblaciones B y C (Cuadro 5).

El estadístico F, mostró un valor mayor para las subpoblaciones A y B, pero menor para la subpoblación C (Cuadro 5). La prueba T apareada, disponible en Info Gen, para la comparación de medias relacionadas con la heterocigosidad esperada, mostró que la

subpoblación C es significativamente menos diversa que las subpoblaciones A y B, las cuales no presentan diferencias significativas entre ellas (P<0,05) (Figura 9).

Cuadro 5. Análisis descriptivo de la diversidad genética para subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

Subpoblación	*N*	*A*	*NE (±) SE*		*HO (±) SE*		*He (±) SE*		*AP*	*F (±) SE*	
A	67	11,78	6,163	1,133	0,475	0,052	0,745	0,016	7,09	0,315	0,078
B	37	7,92	4,818	0,777	0,486	0,034	0,696	0,049	2,15	0,211	0,063
C	60	6,35	2,211	0,999	0,250	0,078	0,372	0,078	1,0	0,166	0,069

N: Número de muestras por subpoblación; A: Riqueza alélica; NE: Media del número efectivo de alelos por locus; Ho: Media de heterocigosidad observada; He: Media de heterocigosidad esperada; AP: Media de alelos privados; F: índice de fijación y SE: Error estándar.

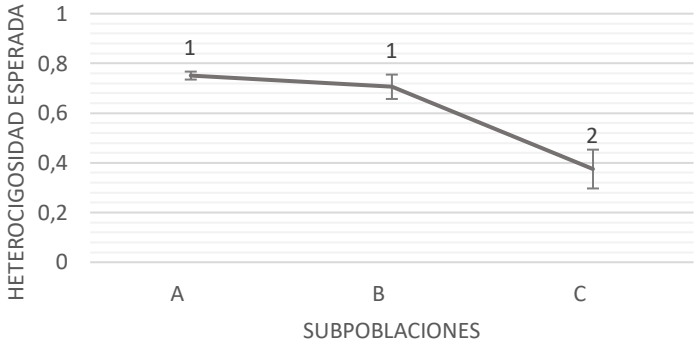


Figura 9. Prueba T apareada disponible en Info Gen para la heterocigosidad esperada (He) en cada subpoblación de *C. odorata* en una matriz del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras Números diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

2.4.4. Caracterización fenotípica y ecogeográfica de subpoblaciones

De forma descriptiva, las poblaciones A, B y C de *C. odorata* presentan algunas diferencias en cuanto a uso de suelo, fenología, procedencia, DAP (cm), altura (m) y altitud (msnm).

El uso de suelo en las tres subpoblaciones fue muy variable; sin embargo, las tres presentaron una mayor cantidad de individuos en cafetales, cercas y potreros y menor cantidad de individuos en bosques, cacaotales y frutales (Figura 10), lo cual es de esperar en el territorio debido a que los cafetales y potreros son los usos de suelo más abundantes.

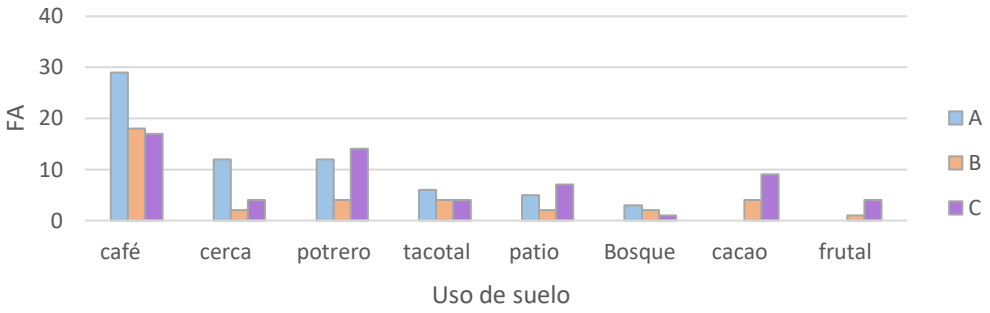


Figura 10. Tipificación de la categoría uso de suelo para las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. A, B y C representan las subpoblaciones identificadas

De acuerdo con el estado fenológico, la subpoblación C presentó cerca de un 81% de individuos en estado reproductivo, mientras que las subpoblaciones A y B mostraron ligeramente una mayor cantidad de individuos en estado vegetativo (53,7% y 54,1% respectivamente) (Figura 11). Mientras que para la procedencia, los árboles regenerados de forma natural fueron más abundantes en las subpoblaciones B y C (Figura 11).

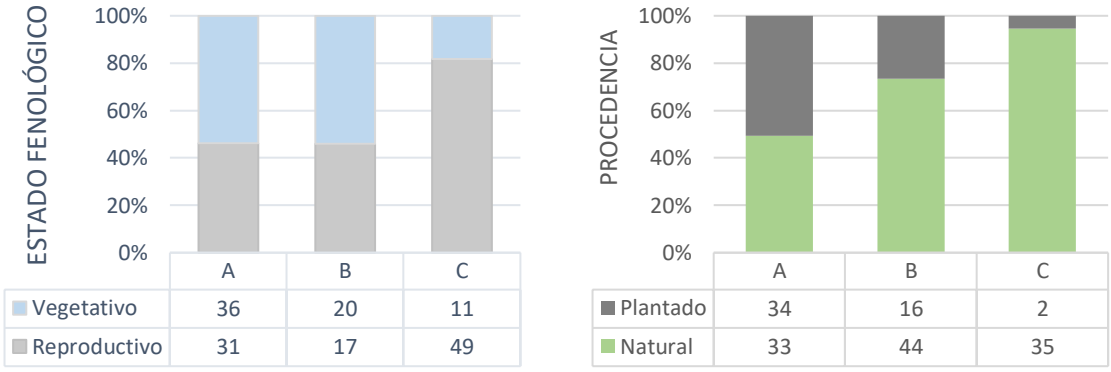


Figura 11. Tipificación de variables categóricas para las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. El gráfico izquierdo representa el porcentaje de árboles para la categoría estado fenológico (vegetativos y reproductivos) y el derecho el porcentaje de árboles para la categoría procedencia (plantados y regenerados de forma natural).

El ANOVA para la categoría DAP mostró diferencias significativas entre las medias de las subpoblaciones ($F=15,24$; $gl=2$; $P<0,0001$; $\alpha=0,01$). Con la prueba LSD de Fisher se determinó que el DAP de la subpoblación B difiere significativamente del de las subpoblaciones A y C (Figura 12).

La altura promedio de los árboles también mostró diferencias significativas mediante el análisis de varianza realizado (F=13,18; gl=2; P<0,0001; α=0,01). La prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher determinó que la subpoblación B posee una mayor altura, seguida de la subpoblación C y por último la subpoblación A con aproximadamente 21 m de altura promedio (Figura 12).

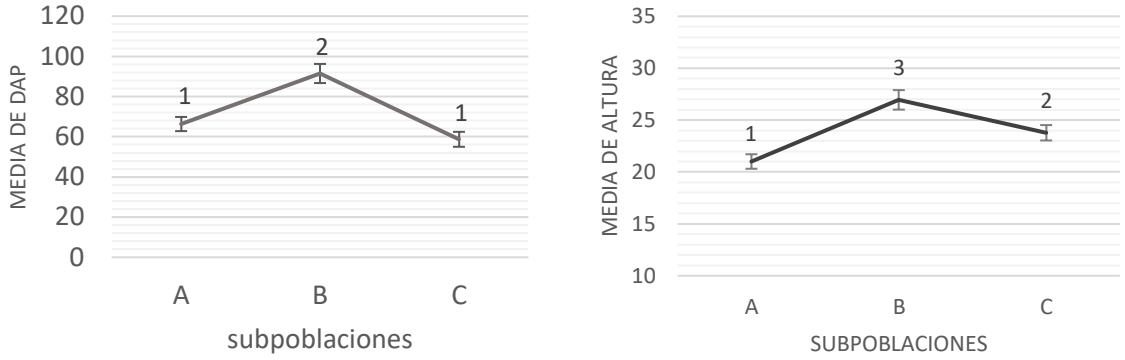


Figura 12. Prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher para las variables DAP (izquierda) y altura de los árboles (derecha) entre las subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01).

Por último, la variable altitud (msnm) fue la que mayor relación presentó con los valores genéticos de las subpoblaciones. Mediante el ANOVA se determinó que existen diferencias significativas entre las medias altitudinales (F=5,02; gl=2; P=0,0077; α=0,01). La prueba LSD de Fisher estableció que la subpoblación C se ubica en una altitud media, mientras que entre las subpoblaciones A y B no se detectaron diferencias significativas (Figura 13).

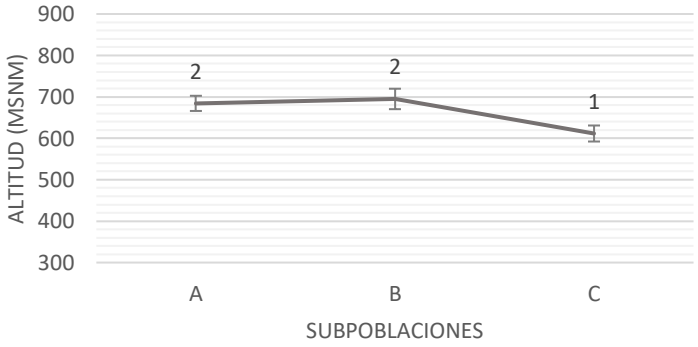


Figura 13. Prueba de comparaciones múltiples LSD de Fisher para la variable altitud (msnm) entre las diferentes subpoblaciones de *C. odorata* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01).

2.4.5. Ubicación geográfica de subpoblaciones

Los árboles de *C. odorata* de cada subpoblación identificada se encuentran muy dispersos en la matriz de estudio; sin embargo, el ANOVA realizado a los valores de latitud y longitud de las muestras indica que latitudinalmente (F=15,65; gl=2; P<0,001, α=0,01) las subpoblaciones presentan diferencias significativas. La prueba LSD de Fisher muestra que la subpoblación A es significativamente diferente a las subpoblaciones B y C. Mientras que las

coordenadas longitudinales no mostraron diferencias significativas entre las subpoblaciones (Figura 14 y 15).

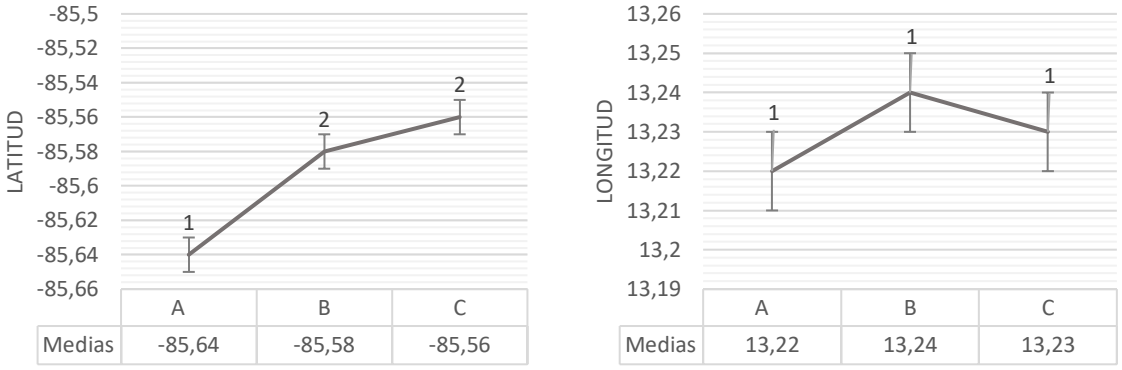


Figura 14. Representación de la Prueba LSD de Fisher aplicada a las coordenadas latitudinales (izquierda) y longitudinales (derecha) de los árboles de las subpoblaciones de *C. odorata* de una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Números diferentes indican diferencias significativas (P< 0,01).

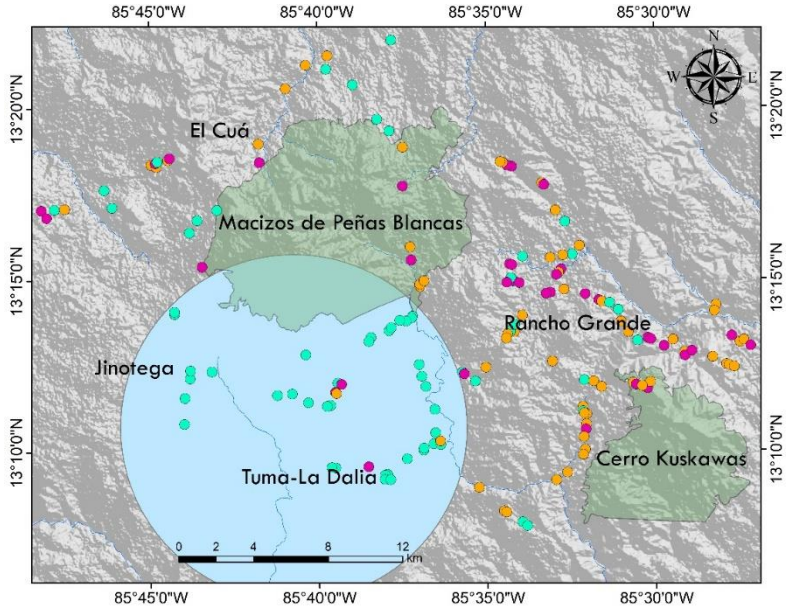


Figura 15. Ubicación geográfica de las subpoblaciones de *C. odorata* identificadas por *Structure* en una matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras. Círculos celestes: subpoblación A; círculos morados: subpoblación B; círculos naranjas: subpoblación C. Círculo grande celeste indica el sitio de mayor agrupación de la subpoblación A.

2.5. Discusión

2.5.1. Diversidad genética poblacional

La variabilidad genética poblacional de *C. odorata* fue intermedia. Los resultados obtenidos indican una riqueza alélica promedio de 18,90 alelos por locus; una heterocigosidad esperada de 0,76 ± 0,01 y una heterocigosidad observada de 0,40 ± 0,04. Esto muestra que los valores de riqueza alélica se encuentran dentro del ámbito reportado por Hernández *et al*. (2008) (A= ámbito de 14 a 30 alelos por locus); mientras que el promedio de heterocigosidad observada se encuentra muy por debajo a los ámbitos publicados por estos autores (Ho= 0,61 a 0,88) para árboles de Costa Rica.

Los niveles de heterocigosidad esperada no son muy diferentes a los encontrados por Soldati *et al*. (2013), quienes al estudiar con marcadores SSR la especie *C. balanceae* en una población con bajos niveles de divergencia genética, identificaron una He= 0,643, mientras que con marcadores AFLP identificaron una He= 0,222. Valores similares fueron reportados por de la Torre *et al*. (2008), quienes con marcadores AFLP estudiaron poblaciones de *C. odorata* con una moderada divergencia genética (F_{ST}=0,15) y encontraron valores de heterocigosidad total Ht=0,22.

Zelener *et al.* (2001), lograron identificar niveles de He=0,643 para poblaciones de *C. lilloi* y *C. balanceae* con bajos niveles de divergencia genética (F_{ST}=0,049) en los Yungas bolivianos y la selva Tucumano-Bolivia. Mientras que para el Pacífico nicaragüense las poblaciones de *C. odorata* han presentado promedios de He=0,347 y Ho=0,524, en poblaciones con una diferenciación genética intermedia (G_{ST}=0,133) (Tijerino *et al*. 2016).

En el presente estudio, la heterocigosidad esperada poblacional (0,76) fue casi el doble que la heterocigosidad observada (0,40), por lo que al analizar el F de Wright se tiene un valor de F=0,44, lo que indica una moderada deficiencia de individuos heterocigóticos respecto al equilibrio de Hardy Weinberg en la población; posiblemente causado por la presencia de cruces entre individuos estrechamente emparentados (Weir y Cockerham 1984).

2.5.2. Factores fenotípicos y ecogeográficos como criterio de clasificación

En una población pequeña la selección de caracteres a priori como criterios de clasificación y estructuración poblacional, no muestra en todas las ocasiones el grado de divergencia real entre las poblaciones de un territorio, por lo que se considera importante el análisis de estructura utilizando únicamente el componente genético como se muestra en el acápite 2.5.3.

Los rasgos fenotípicos y ecogeográficos como criterios de estructuración genética en la población de *C. odorata* mostraron bajos niveles de F_{ST}. El uso del suelo, el estado fenológico, la procedencia y el DAP tuvieron un ámbito entre 0,026 y 0,052, donde el estado fenológico presentó el mayor valor de diferenciación genética. No obstante, la variabilidad genética de la población fue mejor explicada por la variabilidad dentro de los individuos (57% a 58%), y la variabilidad dentro de cada subgrupo (38% a 39%); por lo que, a pesar de ser estadísticamente significativos (P=0,001), no se consideran criterios que estén generando una divergencia en la población.

Además de lo anterior, los factores fenotípicos pueden generar resultados sesgados debido a su interacción con factores ambientales, lo que puede provocar que simplemente se esté midiendo la plasticidad fenotípica o epigenética de la especie y no divergencias genéticas (Hillis 1987, Phillips-Mora *et al*. 1995, Powell *et al*. 1996).

2.5.3. Identificación de subpoblaciones por *Structure*

El análisis de estructura genética aplicado a la población de *C. odorata* tomando en cuenta únicamente la información genética de la especie, mostró más claramente la presencia de una estructura genética poblacional $\Delta K= 3$.

El coeficiente de diferenciación genética $F_{ST}=0,30$ indica una alta divergencia genética entre las subpoblaciones identificadas (A, B y C); sin embargo, estos altos niveles de divergencia genética son más conocidos en poblaciones separadas espacialmente por grandes distancias y con reducidos niveles de flujo genético. Por eso, la existencia de una estructura genética bien definida en un área delimitada del paisaje centinela (500 km^2), implica la existencia de uno o más factores ecogeográficos, ecológicos o humanos que contribuyen a la formación de esta variación genética.

Cavers *et al*. (2003), encontró valores de diferenciación genética entre 0,20 y 0,47 en poblaciones de *C. odorata* separadas por barreras montañosas y con condiciones climáticas diferentes; mientras que en esta investigación los árboles más distantes se encontraban a una distancia de 38 km unos de otros y las condiciones ambientales no se mostraron muy diferentes.

Por su parte, De la Torre *et al.* (2008), encontraron una diferenciación genética intermedia ($F_{ST}=0,15$) para poblaciones de *C. odorata;* no obstante, estas de igual forma se encontraban separadas por más de 217 km, al igual que las poblaciones de *Pinus greggi* (Fst=0,379) estudiadas por Parraguirre *et al*. (2002).

En Nicaragua, las poblaciones del ecotipo seco de *C. odorata* evaluadas por Tijerino *et al*. (2016), indicaron niveles de diferenciación genética intermedios (GST=0,133) para

poblaciones separadas por más de 60 km. Además, encontraron niveles promedio de heterocigosidad observada (Ho=0,524), mayores a los niveles promedio de heterocigosidad esperada (He=0,347). Esto muestra que las poblaciones del pacífico del país poseen también una estructura genética en un pequeño territorio y además con muy bajos niveles de diversidad genética al compararlos con las poblaciones estudiadas en esta investigación.

Típicamente valores de F_{ST}> 0,15 se consideran diferenciaciones genéticas grandes entre las poblaciones (Wright 1965, Frankham *et al*. 2004); esto significa que a pesar de la pequeña extensión territorial del área de estudio (50 000 ha), hay factores humanos o ambientales que están influyendo en la divergencia genética poblacional (Frankham *et al*. 2004).

La diversidad genética de las subpoblaciones también es un rasgo muy particular de esta población, debido a que, a pesar de la distribución espacial y la aparente interacción de las subpoblaciones en el paisaje, la diversidad genética de la subpoblación C es significativamente menor que la de las subpoblaciones A y B; lo que podría ocasionar una mayor susceptibilidad de la subpoblación a la erosión genética y a la pérdida de capacidad adaptativa (Frankham *et al*. 2004, Gallo *et al*. 2009).

Los resultados obtenidos podrían reflejar los efectos de la deriva genética aleatoria actuando en la población de cedro, ya que esta afecta usualmente de dos formas a las poblaciones con reducido número de individuos: primero, es la pérdida de heterocigotos y segundo, el incremento en la diferenciación genética entre las poblaciones (Ellstrand y Elam 1993, Lander *et al*. 2010).

Las diferencias en cuanto a fenología y estructura genética podrían mostrar la presencia de diferentes variedades de *C. odorata* en el paisaje, similarmente a lo encontrado por Cavers *et al*. (2013), aunque a una escala menor. Es decir, existe la posibilidad de que varios haplotipos o subespecies se encuentren interactuando en una matriz agropecuaria con diferentes usos de suelo. La forma de comprobar esto podría ser con el desarrollo de investigaciones de ADN cloroplástico.

Sin embargo, debe considerarse también el efecto de la altitud en la fenología de las subpoblaciones. Fischer y Lüdders (2002), identificaron que las diferencias altitudinales en cultivos de *Physalis peruviana* L. producían una influencia en el crecimiento y desarrollo de estos. Vera (1995), también encontró diferencias fenológicas causadas por la altitud para taxones arbustivos de las familias Leguminosae y Ericaceae. La influencia de la altitud en la generación de microclimas puede afectar, por ende, los periodos de floración de los individuos, pudiendo producir pequeños grupos que solo se reproducen entre ellos durante periodos de tiempo específicos.

2.5.4. Aplicación de resultados genéticos para el manejo poblacional de *C. odorata* en un paisaje fragmentado, considerando el componente genético como una fuente potencial de semillas para restauración y conservación *Circa situm*

La UICN reconoce la importancia de la diversidad genética para la conservación de los recursos naturales, principalmente por la importancia que presentan para la evolución de los organismos, así como por la relación directa existente entre diversidad genética y adaptabilidad de las poblaciones (Reed y Frankham 2003).

De acuerdo con Caballero y Toro (2002), la diversidad genética (He) es uno de los indicadores más aptos para establecer un criterio de conservación. En este sentido, la diversidad genética encontrada en la población de *C. odorata* indica que los árboles de las subpoblaciones A y B son los más diversos genéticamente y pueden ser considerados como fuentes potenciales de germoplasma.

La obtención de germoplasma con baja diversidad genética es un problema generalizado en los proyectos de restauración; en especial en los vinculados con la reducción de la vulnerabilidad al cambio climático. En muchas ocasiones la falta de fondos económicos influye en la compra de plántulas en función del precio más bajo, lo que genera la utilización de plántulas o semillas de baja calidad. Sin embargo, es necesario realizar más investigación que ayude a comprender los patrones de diversidad genética adaptativa (Jalonen *et al.* 2017).

Los resultados de esta investigación respecto a los niveles de diversidad genética altos pueden servir para considerar las subpoblaciones A y B como grupos con una buena aptitud poblacional en comparación a la subpoblación C (Reed y Frankham 2003), pudiendo de esta forma ser aprovechadas como fuentes de semillas para la generación de estrategias de restauración forestal (Gallo *et al.* 2009).

Además, si se tiene presente que la utilización de material genético nativo es una de las mejores estrategias para obtención de germoplasma (Broadhurst *et al*. 2008), las subpoblaciones A y B (en especial la A por su delimitación geográfica), podrían ayudar a proveer semillas locales y adaptadas a las condiciones ambientales del área de estudio. Pero debido a que no se comprenden claramente las causas de la alta estructura genética de la población, la recomendación no es muy acertada y, se hace necesario profundizar la investigación para explicar el porqué de la divergencia genética encontrada.

Por otro lado, la subpoblación C, al presentar los niveles más bajos de diversidad genética no puede ser considerada como fuente de semilla para llevar a cabo procesos de restauración forestal. Sin embargo, es un área de especial atención ya que sus niveles bajos de diversidad y riqueza genética aumentan los riesgos de una extinción local (Templeton *et al.* 1990), haciendo ideal el desarrollo de programas de recolonización para conservar su diversidad genética (Gallo *et al.* 2003).

Las estrategias de conservación y reforestación basadas en fincas o áreas productivas son de especial importancia por ser sistemas de conservación *Circa situm*. Este tipo de conservación es relevante en el territorio debido a la poca existencia de árboles de cedro en

las áreas boscosas, así como a la creciente expansión de monocultivos y pastizales (Boshier *et al*. 2004).

En el área de estudio se constató que los árboles de *C. odorata* son prácticamente inexistentes en los bosques naturales de las áreas naturales protegidas del Macizo Peñas Blancas y El Cerro Kuskawás, por lo que la conservación de los recursos genéticos está desarrollándose únicamente en las fincas del territorio (conservación *Circa situm*). El desarrollo de programas de conservación con sistemas agroforestales ayudaría a potencializar este sistema de conservación basado en los productores.

2.6. Conclusiones y recomendaciones

A nivel poblacional se encontró una riqueza alélica moderada, pero con bajos niveles de heterocigosidad observada, lo que podría indicar una deficiencia de individuos heterocigóticos en la población posiblemente causada por el apareamiento entre individuos estrechamente relacionados.

La selección de caracteres *a priori* como criterios de clasificación puede no ser siempre la mejor forma de medir la estructura genética poblacional; sin embargo, el estudio de la estructura genética tomando como criterio de clasificación únicamente las frecuencias genéticas puede mostrar resultados interesantes en cuanto a la divergencia genética en territorios pequeños (50 000 ha en esta investigación).

Los niveles altos de diferenciación genética no son comunes en territorios tan pequeños y con bajas diferencias climáticas; por lo que se estima que la divergencia genética puede estar siendo influenciada por los efectos de una deriva genética producida por cuellos de botella creados a causa de la explotación selectiva de la especie. No obstante, es necesario realizar más investigación al respecto.

Las subpoblaciones identificadas mostraron diferencias significativas entre los niveles de diversidad genética, siendo las subpoblaciones A y B más diversas y la subpoblación C menos diversa. La única explicación de estas diferencias es el comportamiento descriptivo en los estados fenológicos de las subpoblaciones y las diferencias estadísticas en altitud (msnm).

La relación entre el estado fenológico de los árboles y la diversidad genética de cada subpoblación podría ser una manifestación de diferentes subespecies o poblaciones con haplotipos diferentes interactuando en este pequeño paisaje.

La altitud, por su parte, podría sugerir condiciones microclimáticas diferentes que pueden afectar al mismo tiempo la fisiología de los árboles al modificar los estados fenológicos de estos. Como producto final se pueden estar generando subgrupos que únicamente tienen la

posibilidad de reproducirse con otros individuos a la misma altitud y que presentan los mismos periodos de floración. Para corroborar estas aseveraciones es necesario el desarrollo de investigaciones fenológicas con periodos de observación en campo mayores.

En cualquiera de los contextos mencionados, la subpoblación C tiene los niveles más bajos de diversidad genética y difícilmente puede considerársele como una fuente adecuada de semillas para procesos de restauración; por tanto, la atención debe centrarse en evitar que esta subpoblación desaparezca, desarrollando estrategias de reforestación especialmente llevadas a cabo por los productores (conservación *Circa situm*).

En los procesos de recolección de semillas para restauración debe considerarse la estructura genética poblacional. De lo contrario, podrían generarse estrategias de reforestación que introduzcan material con baja diversidad genética y con altos niveles de homocigosidad que podrían poner en riesgo la sostenibilidad de las poblaciones de cedro en el paisaje.

Sin embargo, es necesario el desarrollo de más investigaciones que ayuden a explicar qué factores han causado la estructura genética poblacional y que ayuden a comprender las relaciones entre las variables fenológicas, la altitud y la estructura genética de la población de *C. odorata* en la matriz agropecuaria del Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

2.7. Agradecimientos

Agradecemos el apoyo del Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD); al Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) y al programa de Bosques, Árboles y Agroforestería (FTA), por el financiamiento dado para la realización de esta investigación. De igual forma se agradece a la Facultad de Agricultura Tropical de Czech University of Life Sciences Prague por el préstamo de equipos y donación de materiales y reactivos para los análisis moleculares. También agradecemos a los propietarios de las fincas que permitieron la recolección de muestras en el Paisaje Centinela Nicaragua-Honduras.

2.8. Literatura citada

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.

Amores C, FM. 2015. Contribución de los árboles en finca a los medios de vida de familias rurales en dos sitios contrastantes de Nicaragua. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 89 p.

Balzarini, M; Di Rienzo, J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

Baucom, RS; Estill, JC; Cruzan, MB. 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

Bawa, KS; Dayanandan, S. 1998. Global climate change and tropical forest genetic resources. Climatic Change 39:473-485.

Boshier, D; Gordon, JE; Barrance, AJ. 2004. Prospects for *circa situm* tree conservation in Mesoamerican dry forest agro-ecosystems. *In* Frankie, G; Mata, A; Vinson, S (eds.). Biodiversity Conservation in Costa Rica: Learning the Lessons in the Seasonal Dry Forest Berkeley, United States of America, University of California Press. p. 210-226.

Broadhurst, LM; Lowe, A; Coates, DJ; Cunningham, SA; McDonald, M; Vesk, PA; Yates, C. 2008. Seed supply for broadscale restoration: maximizing evolutionary potential. Evolutionary Applications 1:587-597.

Caballero, A; Toro, MA. 2002. Analysis of genetic diversity for the management of conserved subdivided populations. Conservation Genetics 3:289-299.

Cavers, S; Navarro, C; Lowe, AJ. 2003. 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; Telford, A; Arenal Cruz, F; Pérez Castañeda, AJ; Valencia, R; Navarro, C; Buonamici, A; Lowe, AJ; Vendramin, GG. 2013. Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. Journal of Biogeography 40(4):732-746. doi 10.1111/jbi.12086

CBD (Convenio sobre la Diversidad Biológica). 2010. Plan Estratégico para la Diversidad Biológica 2011-2020. Quebec, Canadá, Secretaría del Convenio sobre la Diversidad Biológica. 2 p.

Cintrón, BB. 2000. *Cedrela odorata* L. Cedro hembra, Spanish cedar. *In* Francis, J; Lowe, C (eds.). Trabanino, S (trad.). Bioecología de árboles nativos y exóticos de Puerto Rico y las Indias Occidentales. Río Piedras, Puerto Rico, Instituto Internacional de Dasonomía Tropical. p. 128-134.

Colpaert, N; Cavers, S; Bandou, E; Caron, H; Gheysen, G; Lowe, AJ. 2005. Sampling tissue for DNA analysis of trees: trunk cambium as an alternative to canopy leaves. Silvae Genetica 54(6):265-269.

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* Cordero, J; Boshier, D (eds.). Árboles de Centroamérica: Un manual para extensionistas. s. l., OFI/CATIE. p. 447-452.

Davies, SJ; Cavers, S; Finegan, B; White, A; Breed, MF; Lowe, AJ. 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, JP. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. Forest Ecology and Management 255:334-339.

Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2016. InfoStat, Versión 2016. Córdoba, Argentina, Universidad Nacional de Córdoba.

Doyle, JJ. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin Botanical Society of America 19:11-15.

Earl, DA. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics Resources 4(2):359-361.

Ellstrand, NC; Elam, DR. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics 24:217-242.

Esquivel, MJ; Harvey, CA; Finegan, B; Casanoves, F; Skarpe, C; Nieuwenhuyse, 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(8):2611-2620.

Excoffier, L; Smouse, PE; Quattro, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131(2):479-491.

Faleiro, FG; Araújo, IS; Bahia, RCS; Santos, RF; Yamada, MM; Ahnert, D. 2002. Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando a obtenção de marcadores RAPD. Agrotrópica 14(2):31-34.

Fischer, G; Lüdders, P. 2002. Efecto de la altitud sobre el crecimiento y desarrollo vegetativo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Comalfi 29(1):1-10.

Frankham, R; Ballou, JD; Briscoe, DA. 2004. A primer of conservation genetics. Nueva York, United States of America, Cambridge University Press. 236 p.

Fundenic (Fundación Nicaragüense para el Desarrollo Sostenible). s. f. Evaluación y redefinición del Sistema de Áreas Protegidas: Macizos de Peñas Blancas. Nicaragua. 18 p.

Gallo, LA; Marchelli, P; González Peñalba, M; Chauchard, L; Vellido, S. 2003. Genética de poblaciones en la definición de áreas protegidas. Argentina. 158 p.

Gallo, LA; 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

Gillies, ACM; Navarro, C; Lowe, AJ; Newton, AC; Hernandez, M; Wilson, J; Cornelius, JP. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. Heredity 83:722-732.

Hanson, TR; Brunsfeld, SJ; Finegan, B; Waits, LP. 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, GG; Navarro, C; Cavers, S. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. Conservation Genetics 9(2):457-459. doi 10.1007/s10592-007-9334-y

Hillis, DM. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18:23-42.

Holdridge, LR. 1982. Ecología: basada en zonas de vida. . Jiménez, SH (trad.). San José, Costa Rica, IICA. 216 p.

Inafor, (Instituto Nacional Forestal, Nicaragua). 2009. Resultados del inventario nacional forestal: Nicaragua, 2007-2008. León Lau Williams, W (ed.). Managua, Nicaragua. 232 p.

Jakobsson, M; Rosenberg, NA. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. Bioinformatics 23(14):1801-1806.

Jalonen, R; Valette, M; Boshier, D; Duminil, J; Thomas, E. 2017. Forest and landscape restoration severely constrained by a lack of attention to the quantity and quality of tree seed: Insights from a global survey. Conservation Letters:1-9. doi 10.1111/conl.12424

Kalinowski, ST. 2004. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. Conservation Genetics 5:539-543.

Lander, TA; Boshier, DH; Harris, SA. 2010. Fragmented but not isolated: contribution of single trees, small patches and long-distance pollen flow to genetic connectivity for *Gomortega keule*, an endangered Chilean tree. Biological Conservation (11):2583-2590. doi 10.1016/j.biocon.2010.06.028

Ledig, FT. 1992. Human impacts on genetic diversity in forest ecosystems. Oikos 63(1):87-108.

Marena (Ministerio del Ambiente y los Recursos Naturales de Nicaragua)/Inafor (Instituto Nacional Forestal, Nicaragua). 2002. Guía de especies forestales de Nicaragua. Managua, Nicaragua, Editora de Arte, S.A. 304 p.

Muellner, AN; Pennington, TD; Chase, MW. 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; 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.

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

Parraguirre, C; Vargas, J; Ramírez, P; Azpíroz, HS; Jasso, J. 2002. Estructura de la diversidad genética en poblaciones naturales de *Pinus greggü* Engelm. Revista Fitotecnia Mexicana 25(3):279-287.

Patiño V, F. 1997. Recursos genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotrópicos: Propuestas para acciones coordinadas (en línea). Roma, Italia, FAO. Consultado 30 nov. 2016. Disponible en http://www.fao.org/docrep/006/AD111S/AD111S00.HTM

Peakall, R; Smouse, PE. 2015. Appendix 1–Methods and Statistics in GenAlEx 6.1. Canberra, Australia, The Australian National University. 26 p.

Phillips-Mora, W; Rodríguez R, H; Fritz, PJ. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones de cacao, *Theobroma cacao* (en línea). Turrialba, Costa Rica, CATIE. 173 p. (Informe Técnico No. 252). Consultado 26 nov. 2017. Disponible en http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A4119e/A4119e.pdf

Powell, W; Morgante, M; Andre, C; Hanafey, M; Vogel, J; Tingey, S; Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular Breeding 2(3):225-238. doi 10.1007/BF00564200

Pritchard, JK; Stephens, M; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155:945-959.

Reed, DH; Frankham, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. Conservation Biology 17(1):230-237.

Rosenberg, NA. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Resources 4(1):137-138.

SoftGenetics. 2016. Genemarker: The biologist friendly software (en línea, sitio web). Consultado: 10 oct. 2017. Disponible en https://softgenetics.com/GeneMarker.php

Soldati, MC; Fornes, L; Van Zonneveld, M; Thomas, E; Zelener, N. 2013. An assessment of the genetic diversity of *Cedrela balansae* C. DC. (Meliaceae) in Northwestern Argentina by means of combined use of SSR and AFLP molecular markers. Biochemical Systematics and Ecology 47:45-55.

Templeton, AR; Shaw, K; Routman, E; Davis, S. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. Annals of the Missouri Botanical Garden 77(1):13-27. doi 10.2307/2399621

Tijerino, A; Callejas, L; Cerda-Granados, DA. 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

Vera, ML. 1995. Efecto de la altitud en la fenología de la floración en especies arbustivas del norte de España. Lagascalia 18(1):3-14.

Weir, BS; Cockerham, CC. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38(6):1358-1370.

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

Zelener, N; Soldati, MC; Inza, MV; Aguirre, RR; Salek, D; Araujo, A; van Zonneveld, M; Fornes, L. 2001. Distribución geográfica de la diversidad genética molecular de dos especies de Cedrela (*C. lilloi y C. balansae*) sujetas a severos procesos de degradación en la Selva Tucumano-boliviana (en línea). Argentina. 16 p. Consultado 05 ene. 2017. Disponible en http://www.mapforgen.org/proyectos.php#Cedrelalilloi