



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE BIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIODIVERSIDAD Y
CONSERVACIÓN

Efecto del manejo sobre la variabilidad genética de *Cedrela odorata* L., en
el estado de Hidalgo

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN
BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN

Presenta;

Biól. Manuel Alejandro Macedo Villarreal

Codirector: Dr. Pablo Octavio Aguilar
Codirector: Dr. Francisco Federico Núñez de Cáceres González

Mineral de la Reforma, Hidalgo., Octubre 2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 23 de abril de 2018.

Número de control: ICBI-D/351/2018
Asunto: Votos aprobatorios.

M. en C. Julio César Leines Médico
Director de Administración Escolar

Por este conducto le comunico que después de revisar el trabajo titulado **“Efecto del manejo sobre la variabilidad genética de *Cedrela odorata* L., en el estado de Hidalgo.”**, que presenta el alumno de la Maestría en Ciencias en Biodiversidad y Conservación **Biól. Manuel Alejandro Macedo Villarreal**, el Comité Revisor de tesis ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Comité Revisor.

PRESIDENTE	Dr. Arturo Sánchez González
SECRETARIO	Dr. Francisco Federico Núñez de Cáceres González
VOCAL	Dr. Pablo Octavio Aguilar
SUPLENTE	Dra. Dolores González Hernández



Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”

DR. OSCAR RODOLFO SÁENZ CASTILLO
 DIRECTOR DEL ICBI



IGMG/LVCL



Ciudad del Conocimiento
 Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
 Colonia Carboneras
 Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
 Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
 direccion_icbi@uaeh.edu.mx

DEDICATORIA

A mi Familia;

A mi Madre que con su infinito amor y apoyo me ayudo a crecer en el ámbito académico, profesional y principalmente como persona. Jamás alcanzare a comprender como puede existir tanto amor en una persona.

A mi Padre que me inculco desde niño el amor por la lectura y el conocimiento y quien siempre tiene sabiduría para compartir. Siempre seré ese niño buscando constelaciones con su papa.

A mi hermana quien tiene una confianza completa en mí, lo cual agradezco mucho más de lo que hago saber, ella está siempre orgullosa de mí y yo siempre lo estaré de ella.

A mi amor;

A Paulina quien cambio mi perspectiva de la vida completamente, quien me regala a diario sueños y esperanza que no pensé necesitar nunca, cada día me haces mejor persona y jamás podré pagarte todo lo que haces por mí. Te amo marmota.

A mis amigos;

A Karina, Raquel, Gustavo y Daniel, compañeros, colegas y amigos con quienes comparto, sueños, victorias, fracasos y un amor a la vida, lo cual nos une aún más.

A Chepis, Naishla, Daniela, y Mario, quienes sufrieron conmigo los contratiempos del trabajo en laboratorio y de quienes espero grandes cosas.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco, investigador del laboratorio de conservación del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del estado de Hidalgo quien amablemente facilito instrumental de laboratorio con el cual fue posible concluir en tiempo con la parte experimental del proyecto.

A la Dra. Dolores Gonzales Hernandez del Instituto de Ecología, que sin dudarlo ni conocerme accedió a asesorar el proyecto de Tesis, y quien apporto inmensamente en este trabajo y me ayudo a mejorar académicamente.

Al Dr. Arturo Sanchez Gonzales cuyo conocimiento y apoyo resultaron invaluable en la realización de mi proyecto de tesis, su constancia y profesionalismo son un ejemplo para mí.

Al Dr. Francisco Federico Nuñez de Cáceres Gonzalez quien me guio en la parte experimental del proyecto, y me enseñó que uno nunca se debe conformar con la manera que son las cosas, si no que siempre se tiene que buscar una mejora y solución a todos estos problemas.

Al Dr. Pablo Octavio Aguilar a quien con su conocimiento y carisma me convenció de realizar mi maestría en esta institución, agradeceré infinitamente todo el tiempo, esfuerzo y principalmente paciencia que me tuvo, su amor por la ciencia y su excelencia como profesor y ser humano es una constante guía para mí y para todas las personas que fuimos afortunados en recibir clases y trabajar con usted. Espero nuestros caminos se crucen nuevamente.

Al proyecto INFR-252807 otorgado al Cuerpo Académico de Ecología de la UAEH, a cargo del Dr. Fernando Rosas Pacheco.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la catedra otorgada al Dr. Francisco Federico Núñez de Cáceres CT-1245

A la Secretaria de Educación Pública que otorgo los recursos PRODEP/UAEH-PTC-631 al Dr. Pablo Octavio Aguilar

A los Maestros en Ciencias Nahieli Paulina de la Cruz Morales, Raquel Hernandez Austria, Gustavo Montiel Canales y José Daniel Lara Tufiño quienes fueron esenciales para la parte de campo del proyecto, sin ustedes hubiera sido imposible, gracias por soportar a esta tortuga.

Al Sr. Gil Hernandez Bautista, a la Sra. Isabel Austria Velasco y a la Familia de la Cruz, que gracias a su amabilidad y hospitalidad se concluyó el proyecto en tiempo.

A CONACYT por la beca otorgada, sin la cual hubiera sido imposible la realización de este proyecto.

CONTENIDO

Índice de cuadros	3
Índice de figuras	4
Abreviaturas	5
Resumen	7
1 Introducción	9
2 Antecedentes	12
2.1 El manejo forestal	12
2.2 El manejo como fuente de perturbación	15
2.3 La variabilidad genética en <i>Cedrela odorata</i>	18
2.4 Especie de estudio	20
3 Hipótesis	23
4 Justificación	24
5 Objetivo General	25
6 Objetivos Particulares	25
7 Materiales y Métodos	26
7.1 Sitios de estudio.....	26
7.2 Extracción de DNA	27
7.3 Amplificación de microsatélites	29
7.4 Análisis de datos.....	30
8 Resultados	34
8.1 Variación genética	34
8.2 Estructura genética	36
8.3 Cuellos de botella	40
9 Discusión	43
9.1 Variación genética	45
9.2 Estructura genética	46
9.3 Cuellos de botella	48
9.4 Proyección y aprovechamiento.....	48
10 Bibliografía	50
11 Anexos	56
11.1 Permiso de colecta	56
11.2 Protocolo de extracción de DNA modificado de Doyle y Doyle (1987).....	59
11.3 Geles de poliacrilamida	60

11.4 Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus y por población Chi cuadrada (ChiSq), grados de libertad (DF), probabilidad (prob) y significancia (Signif). para el equilibrio de Hardy-Weinberg en los nueve loci para seis poblaciones de *Cedrela odorata* evaluados en el estado de Hidalgo..... 61

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1.** Estimaciones para los sistemas de apareamiento en diferentes aislamientos geográficos con sistemas de cruce distintos para *Cedrela odorata* agrupadas a un nivel regional: tm: rango de exocruza de multilocus, ts: rango de exocruza simple, sm: rango de autocruzas de multilocus, ss: rango autocruzas por locus simple, tm-ts: diferencia en exocruzas vs autocruzas multilocus, *f*: coeficiente de endogamia materno por locus simple, rp: correlación de paternidad, rs: correlación de autocruza entre familias (Modificado de Hernández, 2008)..... **19**
- Cuadro 2.** Procedencia y cantidad de individuos colectados para el análisis genético de *Cedrela odorata*..... **27**
- Cuadro 3.** Secuencia y caracterización de los nueve marcadores microsatélites utilizados para la evaluación genética de *Cedrela odorata* en diferentes condiciones de aprovechamiento..... **30**
- Cuadro 4.** Descriptores de la variación genética por población. N: Número de individuos analizados, Na: Número de alelos por locus, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosis observada, He: Heterocigosis esperada, F: Índice de fijación, AP: Número de Alelos Privados por Población, EHW: Equilibrio de Hardy-Weimberg, Con: condición, Nat: Natural, Cul: Cultivo, Apr: Aprovechamiento..... **35**
- Cuadro 5.** Matriz pareada de valores F_{st} (bajo la diagonal) y Número efectivo de migrantes por generación (N_m) (sobre la diagonal). *: diferencias significativas entre poblaciones, corregidas por el método de Bonferroni. **36**
- Cuadro 6.** Descripción de los cuellos de botella identificados en las poblaciones de *Cedrela odorata* del estado de Hidalgo. Locus \neq DM: Locus con diferencias significativas del modelo de equilibrio deriva-mutación, Heq: heterocigosis calculada bajo el modelo de equilibrio deriva-mutación, LD: Loci con deficiencia de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas, LE: Loci con exceso de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas, H: Valor obtenido de la prueba de Wilcoxon, p: Probabilidad de significancia, CB: magnitud del cuello de botella..... **41**

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa de distribución de las poblaciones de *Cedrela odorata* muestreadas en Mesoamérica. Las poblaciones de los linajes del norte y del centro están localizadas en regiones con periodos largos de sequía, de 5 a 7 meses (Fuente: Cavers *et al.* 2003). **18**
- Figura 2.** a) Distribución potencial de los tipos de vegetación con los que se asocia *Cedrela odorata*. b) Niveles de aptitud de distribución potencial actual (Tomado de Gómez *et al* 2007). **22**
- Figura 3.** Fotografía de *Cedrela odorata* L., en la comunidad de Tamala (Tomada por Manuel Alejandro Macedo Villarreal) y esquema (Tomado de Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany). **22**
- Figura 4.** Ubicación geográfica de los sitios de estudio. Se identifican con color rojo las poblaciones bajo manejo, azul los cultivos y negro las poblaciones naturales (Mapa realizado por Montiel-Canales Gustavo)..... **27**
- Figura 5.** Árbol de agrupamiento basado en las distancias corregidas de Nei (Takezaki y Nei, 1996) agrupadas por el método de Neighbor-Joining. **37**
- Figura 6.** a) Determinación de los grupos genéticos con base en la propuesta gráfica de Evanno *et al* (2005). b) Modelo de asignación promedio de los árboles de *Cedrela odorata*, de acuerdo con los grupos genéticos calculados, en las distintas procedencias. **39**
- Figura 7.** Correlación por permutación de Mantel entre las distancias genéticas de Nei y geográficas (km) de las poblaciones Hidalguenses de *Cedrela odorata*. **40**
- Figura 8.** Proyección a diez generaciones de la frecuencia de genotipos heterocigotos en las diferentes condiciones de aprovechamiento, considerando la pérdida de adecuación y la endogamia simultáneamente bajo la fórmula: $H_{0i}=[H_{0i}-(H_{0i}*f)]*w_{ij}$ **43**

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µl	Microlitro
A	Diversidad alélica
AMOVA	Análisis Molecular de Varianza
Apr	Aprovechamiento
CB	Magnitud de Cuello de Botella
cm	Centímetros
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONAFOR	Comisión Nacional Forestal
CTAB	<i>Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide</i> (Bromuro de hexadeciltrimetil-amonio)
Cul	Cultivo
dH ₂ O	Agua destilada
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTPs	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i> (Deoxinucleótidos trifosfato)
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid</i> (Ácido etildiamino-tetraacético)
EHW	Equilibrio Hardy-Weinberg
<i>f</i>	Coefficiente de Fijación
gr	Gramos
H	Valor obtenido de la prueba de Wilcoxon
ha	Hectárea
HCl	Ácido Clorhídrico
<i>H_E</i>	Heterocigosis Esperada
<i>H_{eq}</i>	Modelo de Islas Infinitas
<i>H_O</i>	Heterocigosis Observada
I	Índice Informativo de Shannon
I.A.M.	<i>Infinite Allele Model</i> (Modelo de Alelos Infinitos)
km ²	Kilómetros Cuadrados
LD	Loci con deficiencia de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas
LE	Loci con exceso de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas
m	Metros
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el Nivel del Mar
N	Norte

Nat	Natural
Ne	Número Efectivo de Alelos por Locus
Nm	Número Efectivo de Migrantes por Generación
N-J	<i>Neighbor-Joining</i> (Método de agrupamiento basado en la unión con el vecino más cercano)
N_m	Número de Migrantes por Generación
O	Oeste
p	Probabilidad de significancia
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
pH	Potencial de Iones Hidrógeno
PVP	Polivinil-pirrolidona
RAN	Registro Agrario Nacional
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RPM	Revoluciones por Minuto
SEMARNAT	Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SEMARNATH	Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales de Hidalgo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
tris	Tri -hidroximetil-aminometano
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UNAM	Universidad Autónoma de México
UV	Ultra Violeta
φ	Indicador de Comparaciones Intra e Interpoblacionales
Φ_{ST}	Índice de Diferenciación Poblacional
χ²	Chi Cuadrada

RESUMEN

El presente trabajo constituye una evaluación genética del efecto del aprovechamiento forestal sobre *Cedrela odorata* L. Esta especie arbórea es ampliamente aprovechada por el uso que tiene su madera. Sin embargo, el uso indiscriminado de las poblaciones ha llevado a la especie a un escenario de riesgo, por lo que fue incluida hace menos de 10 años en programas de conservación y en estatus de vulnerabilidad por parte de las leyes mexicanas. No obstante, se carece de información suficiente sobre la afectación del acervo genético de este recurso, aun así se han llevado a cabo acciones de reforestación usando a la especie para generar cultivos; por lo que actualmente se cuenta con poblaciones que fueron sometidas a extracción y manejo, poblaciones limitadas genéticamente al ser producto de cultivos con baja supervivencia y densidad, así como poblaciones relativamente conservadas en zonas aisladas que pudieran constituir la base genética para un potencial uso. En este trabajo se estudiaron poblaciones bajo manejo en el estado de Hidalgo (Coyolapa, municipio de Atlapexco y Tamala, municipio de Tepechuacan de Guerrero); dos cultivos (San Pedro, municipio de Huazalingo y Huextetitla, municipio de San Felipe Orizatlan) así como dos poblaciones naturales (Chinconcoac, municipio de Lolotla y Coatenahuatl, municipio de Huautla). La variación genética resultó alta, con un promedio de $H_o = 0.87 \pm 0.02$ y de $H_e = 0.82 \pm 0.01$. Sin embargo, por condición de aprovechamiento; la variación no se distribuye de manera homogénea, encontrando mayor variación en los cultivos seguido de las poblaciones naturales. Los menores valores de heterocigosis se observan en las poblaciones con extracción, tanto cultivo como manejo. En cuanto al coeficiente de fijación, las poblaciones naturales se encuentran en equilibrio de Hardy-Weimberg, los cultivos y poblaciones bajo manejo presentan exogamia. El análisis de varianza molecular mostró diferencias significativas entre las poblaciones evaluadas, estas conforman tres grupos con alta similitud en las frecuencias alélicas y divergencia jerárquica desde el cluster central (Chinconcoac-Tamala < 0.01), con un siguiente paso de divergencia del cluster superior (Coatenahuatl-Coyolapa $<$

0.2) y una divergencia final en el cluster inferior(San Pedro-Huextetitla < 0.3), este último conformado por los cultivos, mismos que a su vez presentan una divergencia elevada (< 0.4) siendo el cultivo de Huextetitla es el de mayor disimilitud en las frecuencias alélicas. El análisis de asignación de probabilidades bayesianas de los individuos a los grupos genéticos similares dentro y entre poblaciones mostró que existen 10 subgrupos distribuidos de manera diferencial entre las localidades. Los resultados de la prueba de Mantel mostraron que las poblaciones más cercanas resultan ser las naturales y las sometidas a procesos de extracción, por lo que existe una conectividad genética entre Coyolapa-Coatenahuatl y entre Chiconcoac-Tamala. Los análisis de cuello de botella mostraron que todas las poblaciones se han reducido recientemente, al presentar el 100% de los loci evaluados con exceso de heterocigosis calculada bajo el modelo de equilibrio deriva-mutación. La magnitud del cuello de botella también es distinta, en orden ascendente se observa: Tamala, Chiconcoac, Coatenahuatl, San Pedro, Coyolapa y Huextetitla. Estos resultados indican que los dos cultivos no son representativos de la variación genética de la especie, por lo que representan una diversidad no asociada a la distancia. Por otro lado, la extracción en Tamala ha sido severa, lo que se aprecia en la disminución de su adecuación; siendo la más amenazada en la región de estudio, seguida de Coyolapa, también bajo extracción; lo que se aprecia en la intensidad del cuello de botella. En conjunto, el manejo hasta la fecha no ha sido adecuado para el mantenimiento del recurso maderable ya que la extracción está poniendo en riesgo a las poblaciones y el cultivo no representa la diversidad genética en la región.

1 INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética permite a una especie disponer de una serie de respuestas morfo-fisiológicas alternativas, condicionadas por el cambio ambiental, lo que hace posible la adaptación y supervivencia de los individuos. La conservación de la diversidad genética es una condición necesaria para la adaptación y evolución de las poblaciones y especies, por lo tanto, es clave elemental para el mantenimiento de otros niveles de organización de la biodiversidad (Namkoong *et al* 2002).

En general, la pérdida de variabilidad genética es difícil de medir directamente y sus efectos en las poblaciones, así como en la dinámica de los ecosistemas, es usualmente complicado de entender. Consecuentemente es ignorada hasta que es muy tarde para recuperarla o restaurarla (Namkoong *et al* 2002). Aún más, la erosión genética induce la extinción de especies y pérdida de ecosistemas (Frankham *et al* 2002).

Los microsatélites son útiles para evaluar la variación genética dentro y entre poblaciones, permitiendo hacer inferencias sobre la estructura, deriva génica, cuellos de botella génicos y flujo génico (Otero *et al* 1997). Por otra parte, en la biología de la conservación, los microsatélites pueden ser usados para detectar cambios bruscos en el tamaño de las poblaciones, así como establecer el efecto de la fragmentación y el manejo (Hernández 2008).

Dentro de los proyectos de reforestación de sitios neotropicales fragmentados, la genética de la conservación es vital, ya que trata de encontrar una manera de mantener en equilibrio los sistemas de apareamiento de las especies: endogamia y exogamia (Hernández

2008). Uno de los indicadores que representa el estado de homogeneidad y heterogeneidad genética de un individuo, población o especie es su variación, ya que en la medida que exista un mayor número de individuos (genotipos) diferentes, existe el potencial evolutivo, capaz de generar diferentes variantes adaptativas en la progenie, que a su vez tendrán la capacidad de poder instalarse en un mayor número de sitios con características físicas, químicas y biológicas diferentes (Alba-Landa 2005).

Debido a estas razones, se han realizado estudios encaminados a determinar la variabilidad genética de *Cedrela odorata* L.(1753) en países como Costa Rica y Nicaragua (Hernández 2008; Sosa 2011). Esta especie es importante ecológica y económicamente, puesto que brinda recursos maderables de gran calidad lo que representa un ingreso económico, en ocasiones el único, para comunidades rurales. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en México para su conservación el deterioro del hábitat, el uso indiscriminado hasta antes de ser declarada bajo protección especial en México (NOM-059-SEMARNAT 2010), la tala clandestina y la demanda por productos elaborados con su madera; la pone en riesgo inmediato, por lo que existe la necesidad urgente de establecer programas de conservación, propagación y manejo de la especie (Alderete-Chávez *et al* 2005).

Como lo exponen Calva-Soto y Ramos-Frías (2014), al restaurar y reforestar, se introducen de manera intencional individuos que pueden encontrarse muy cercanos o bastante distanciados geográficamente. Esto puede representar un arma de dos filos ya que por un lado puede traer como consecuencia un aumento en la variabilidad genética al

diversificar los alelos entre las poblaciones y por el otro, puede llevar a un proceso de depresión por exogamia cuando los individuos genéticamente diferenciados portan alelos ajenos a las condiciones ambientales del cultivo, propiciando un pobre desempeño que termina con la muerte de los portadores sin dejar descendencia. En México, por lo regular; no se toman en cuenta estos aspectos genéticos al desarrollar los proyectos de restauración. Usualmente prevalecen presiones sociales y económicas en los bosques sin importar las necesidades ecológicas, lo que influye directamente en la diversidad fitogenética (Hernández 2008). Por esta razón sería preciso que al seleccionar los individuos se proponga la realización de estudios genéticos, de modo que se logre conocer la variabilidad genética potencial tanto dentro de las poblaciones reforestadas, como con las poblaciones vecinas. Conocer estos parámetros permitiría la planeación efectiva de proyectos de restauración y el consiguiente manejo eficiente de las poblaciones.

2 ANTECEDENTES

2.1 *El manejo forestal*

El manejo forestal consiste en el aprovechamiento de los recursos forestales mediante programas basados en el conocimiento de los ecosistemas maderables y la forma en que responden a las intervenciones del hombre, considerando las demandas de la sociedad por productos y servicios, de tal modo que los productos se aprovechen, conserven y mejoren en forma sustentable (Flores *et al* 2003). Los recursos forestales cumplen diversas funciones ecológicas (retención de agua, enriquecimiento del suelo, fijación de carbono, mantenimiento de interacciones biológicas) y sociales (productos forestales y no forestales). El manejo forestal ha desarrollado diferentes herramientas para maximizar la producción y disminuir la afectación de los bosques bajo esquemas de aprovechamiento (Gadow *et al* 2004). Por lo que este debería realizarse sobre bases científicas, que garanticen la persistencia de estas funciones para futuras generaciones.

Existe gran variedad de opciones para garantizar la producción sustentable de los bosques, la tarea de la planificación forestal consiste en evaluar el éxito de las estrategias de manejo (Gadow *et al* 2004). Una manera en que el uso forestal puede reducir la presión sobre los recursos genéticos consiste en dirigir la extracción a ciertos individuos, ya sea los mejor conformados, siendo estos los individuos de mayor talla o los más viejos, además de introducir nueva variación a partir de cultivos y reforestación, aumentando la productividad a niveles superiores de aquellos obtenidos en el bosque natural. La conservación de recursos

genéticos puede ser efectiva a pesar de que se utilice regeneración artificial si se sigue como regla replantar con la fuente local la semilla (Vargas *et al* 2004).

La extrema pérdida de recursos forestales no es un problema ajeno al país. México posee una superficie territorial de 196,437,500 hectáreas (**ha**); de las cuales la superficie forestal es de 141,745,168 **ha**. De esta superficie, el 41% corresponde a zonas áridas, el 21% son bosques de coníferas y latifoliadas, el 19% son selvas, el 16% zonas perturbadas y el 3% la componen zonas de vegetación hidrófila y halófila. Si solo se considera la suma de las zonas con mayor potencial de aprovechamiento forestal, es decir bosques y selvas, en adelante denominados ambos solamente bosques, tendremos que éstos componen el 40% de la superficie forestal con una extensión de 56,698,067 **ha** (SEMARNAT2002). Esta cifra representa el 28.9 % de la superficie total del país.

Los recursos forestales mexicanos han sido objeto de poca atención por parte de las autoridades y estrategias económicos del país. Su situación es tal que las empresas forestales únicamente contribuyen con el 3.5 % de la producción nacional total (SEMARNAT-Comisión Nacional Forestal 2005). Uno de los mayores problemas del aprovechamiento forestal, ya sea ejidal, comunal y/o privado, es la pérdida de biodiversidad debido a la falta de conocimientos sobre el valor ecológico de los predios (Ortega 2013). La importancia de un manejo consensuado, racional y equitativo considerando la opinión de los diferentes sectores, es un aspecto prioritario que considerar para el desarrollo sustentablemente del sector forestal a nivel nacional.

Un aspecto relevante es la situación de la tenencia de los recursos forestales en México, la cual se identifica por su carácter colectivo, denominado propiedad social, ya que una gran proporción de los terrenos forestales es propiedad de núcleos agrarios conformados por ejidos y comunidades. De acuerdo con información obtenida del Atlas de Propiedad Social y Servicios Ambientales realizado por el Registro Agrario Nacional (**RAN 2012**), existen 15,584 núcleos agrarios, con superficies mayores a 200 **ha** de extensión, quienes tienen la propiedad de 62.6 millones de **ha** de bosques, selvas y vegetación forestal de zonas áridas, lo que equivale a 45% de la superficie forestal del país.

Para el estado de Hidalgo, la tasa de deforestación se ha estimado en más de 10,000 hectáreas al año. Una estrategia de mitigación ha sido la implementación de programas de reforestación coordinados por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (**SEMARNAT**), la Comisión Nacional Forestal (**CONAFOR**) y el Gobierno del Estado de Hidalgo, a través del “Programa Estatal Forestal del Estado de Hidalgo” (**SEMARNATH 2011**). Sin embargo, las tasas de deforestación superan las acciones de reforestación. Aunado a esto, las plantaciones presentan baja supervivencia (50% o menos), ocasionada por la baja calidad de las plantas, la homogeneidad de la base genética de las fuentes semilleras y/o por la carencia de información sobre la biología de los árboles utilizados en estos programas. Esto en virtud de que se ha privilegiado la cantidad sobre la calidad, al producir plantas en contenedores sin darle el espacio y tiempo necesarios para asegurar que el sistema radicular se fortalezca, el árbol crezca y madure a un tamaño que soporte las condiciones climatológicas del sitio donde se va a plantar (**SEMARNATH 2011**).

2.2 El manejo como fuente de perturbación

El aprovechamiento forestal constituye un tipo de disturbio particular dirigido solo a una especie dentro de las comunidades arbóreas. Tiene múltiples efectos, tanto en las poblaciones maderables como en los organismos asociados a las mismas, lo que constituye eventos acumulativos aparentemente aislados. El efecto de dichos disturbios se denomina "Perturbación" (Rivera-Fernández 2012).

Existen varias definiciones de disturbio, la más directa es la dada por Grime (1977) quien expone que el disturbio es un factor externo que limita la biomasa de una especie al causar la destrucción parcial o total de su entorno. La definición de Pickett y White (1985) menciona que el disturbio es “...cualquier evento discreto relativo en el tiempo que desestabilice ecosistemas, comunidades o estructuras poblacionales, y cambia los recursos, disponibilidad de sustrato, o el cambio ambiental físico...”, una extensión a la definición, propuesta por Pickett *et al*(1989), dice que “...el disturbio es el cambio en la estructura mínima causada por un factor externo al nivel de interés...” Una de las ventajas de esta definición es la visión jerárquica del disturbio, considerado una escala mínima en la cual operan ciertos eventos. De esta forma se puede unificar una definición general de la siguiente manera: El disturbio es un evento puntual, causado por un factor externo con efectos discretos en el tiempo; sobre los recursos bióticos y abióticos necesarios para la supervivencia de las poblaciones, comunidades y especies; con efectos dependientes de un orden jerárquico de la magnitud temporal y espacial del disturbio; además de la suma acumulativa de modificaciones que lleva al incremento en la perturbación.

En estudios ecológicos, la perturbación y el disturbio son utilizados como sinónimos, lo que constituye un problema, porque la definición de un fenómeno ecológico puede ser vital para el diseño experimental en pruebas de hipótesis (Svensson 2010). Rykiel (1985) define a la perturbación como “...*la respuesta de un componente ecológico o sistema ante un disturbio u otro proceso que modifica los atributos del componente o sistema... caracterizados por una dirección magnitud y persistencia...*” Por lo que el disturbio es el agente causante del daño mientras que la perturbación es el efecto acumulativo de disturbios sostenidos en el tiempo.

Es fácil identificar un ecosistema con disturbio cuando éste ha sido transformado de forma definitiva, por ejemplo, en lugares de pastoreo o cuando solo se observa una plancha de concreto. Sin embargo, estas transformaciones drásticas no siempre ocurren (Martorell y Peters 2005). Muchas formas tradicionales de manejo de un ecosistema están basadas en extracción paulatina y de pequeñas cantidades de recursos en un tiempo dado y por lo tanto no se espera que infrinjan cambios inmediatos y completos en el ambiente (Reichhardt *et al* 1994; Toledo *et al* 1994).

Las formas de disturbio directas o completas son fácilmente identificadas y nos dan una clara dicotomía entre un ecosistema con y sin disturbio. Por el contrario, el disturbio crónico crea un gradiente entre sitios naturales o sin disturbio y los ampliamente degradados o con disturbio (Lawton 1998). Martorell y Peters (2005) proponen tres formas de medir el disturbio en una comunidad: a) Métodos basados en la experiencia de personas con amplio conocimiento sobre la historia de los sistemas ecológicos, frecuentemente el resultado es

dicotómico (con o sin disturbio); b) Indicadores bióticos (especies, grupos taxonómicos o descriptores de la comunidad) con atributos correlacionados con la perturbación; c) Indicadores de actividad humana asociados con disturbios puntuales que, en suma, muestran un gradiente de perturbación. Debido a que se tiene contacto directo con ejidatarios y dueños de los terrenos, quienes tienen conocimiento sobre el uso de los recursos forestales en sus tierras, así como los proyectos de reforestación aplicados, es factible utilizar el criterio c).

La extracción de árboles adultos genera un efecto en cascada sobre diversos atributos de las comunidades y las poblaciones como son: la pérdida de cobertura vegetal, el decremento en las tasas de crecimiento de las poblaciones maderables y de otros organismos asociados, la pérdida de variabilidad genética, incrementando el riesgo de invasión de otras especies y la fragmentación, lo que lleva a la pérdida a largo plazo de la productividad de los bosques con actividades forestales (Ghazoul y Shaanker 2004; Schaberg *et al* 2008; Kangalawe y Lyimo 2010). El uso adecuado de los recursos garantiza la permanencia de las poblaciones, siempre y cuando se consideren estrategias de manejo que aseguren la regeneración natural, o en su defecto, se implementen modelos de reforestación con material proveniente de las mismas poblaciones (Acosta-Hernández *et al* 2011). En el caso particular de *Cedrela odorata*, la extracción dirigida sobre los árboles mejor conformados en poblaciones naturales elimina sistemáticamente variación, tanto genética como fenotípica. Los eventos puntuales de aprovechamiento han sido registrados sistemáticamente por los pobladores, además de los esfuerzos por reforestar las comunidades mediante el uso de cultivos. Esto facilita la clasificación de las poblaciones de *C. odorata* de acuerdo con el método “a” propuesto por Martorell y Peters (2005).

2.3 La variabilidad genética en *Cedrela odorata*

Existen pocos estudios de variabilidad genética de *C. odorata* en México, uno de ellos en el sur del país en la península de Yucatán. Cavers *et al.* (2003) estudiaron la filogeografía de *C. odorata* en Mesoamérica, con base en **DNA** de cloroplastos; con muestras de 29 poblaciones en Costa Rica, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua y Panamá. Los autores citados caracterizaron cinco haplotipos los cuales se agruparon filogenéticamente en tres linajes: norte, centro y sur (Figura 1). Los linajes norte y centro eran los más distantes genéticamente uno del otro con nueve mutaciones, seguidos por norte y sur con seis mutaciones y centro y sur con tres mutaciones.

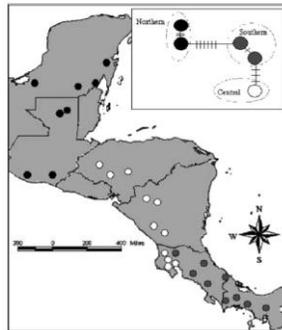


Figura 1. Mapa de distribución de las poblaciones de *Cedrela odorata* muestreadas en Mesoamérica. Las poblaciones de los linajes del norte y del centro están localizadas en regiones con periodos largos de sequía, de 5 a 7 meses (Fuente: Cavers *et al* 2003).

Dentro de estos pocos estudios de variabilidad genética de *Cedrela odorata* se encuentra el de Hernández (2008) el cual utilizó nueve microsatélites como marcadores moleculares (mismos que fueron utilizados en el presente trabajo) para obtener información útil para determinar diversidad génica y sistemas de apareamiento de la especie en Costa Rica

y otros países de Centroamérica y Mesoamérica. En sus resultados reporta que la especie tiene gran variabilidad genética y presenta exogamia en su mayoría (Cuadro 1).

Cuadro 1. Estimaciones para los sistemas de apareamiento endiferentes aislamientos geográficos con sistemas de cruce distintos para *Cedrela odorata* agrupadas a un nivel regional: tm: rango de exocruza de multilocus, ts: rango de exocruza simple, sm: rango de autocruzas de multilocus, ss: rango autocruzas por locus simple, tm-ts: diferencia en exocruzas vs autocruzas multilocus, *f*: coeficiente de endogamia materno por locus simple, rp: correlación de paternidad, rs: correlación de autocruza entre familias (Traducidode Hernández, 2008).

Nivel regional	México		Guatemala		Honduras- Costa Rica	
	Aislamiento 1	Aislamiento 3	Aislamiento 1	Aislamiento 3	Aislamiento 1	Aislamiento 3
tm	0.98(0.07)	0.90(0.00)	1.20(0.00)	1.01(0.08)	1.20(0.05)	1.20(0.00)
ts	0.84(0.04)	0.96(0.01)	0.94 (0.03)	0.92(0.03)	0.87(0.03)	0.95(0.03)
sm	0.02	0.1	-0.2	-0.01	-0.2	-0.2
ss	0.16	0.04	0.06	0.08	0.13	0.06
tm-ts	0.15(0.06)	0.06(0.00)	0.26(0.03)	0.09(0.08)	0.33(0.06)	0.26(0.03)
<i>f</i>	0.06(0.05)	-0.06	0.20(0.13)	0.04(0.07)	0.11(0.05)	0.03(0.06)
rp	0.20(0.05)	0.20(0.01)	0.12(0.05)	0.10(0.03)	0.13(0.03)	0.12(0.04)
rs	0.25(0.07)	0.20(0.01)	0.13(0.04)	0.08(0.04)	0.03(0.03)	0.12(0.04)
Número de donadores de polen	4.88	5	8.33	10.1	7.81	8.85

Altos niveles de variación genética son esperados en especies con una amplia distribución, así como exogamia y elevada fecundidad; puesto que los sistemas de polinización por viento, larga vida de las especies y ocurrencia en hábitats con estados tardíos de sucesión, favorecen el intercambio de alelos entre poblaciones (Hamrick *et al*1979). *Cedrelaodorata* cumple con todas estas características con excepción de la polinización por viento ya que se ha reportado que pequeños insectos, en especial polillas son sus polinizadores con un radio de dispersión de hasta 500 m (Bawa *et al* 1995) aunque sus semillas síson dispersadas por viento, favoreciendo amplios rangos de distribución e incremento de la diversidad genética.

2.4 Especie de estudio

La clasificación taxonómica de *Cedrela odorata* L. es la siguiente;

Reino: Plantae
División: Fanerógama / Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Sapindales
Familia: Meliaceae
Género: *Cedrela*
Especie: *C. odorata* L. 1753

Cedrela odorata L. (Meliaceae), conocida como cedro rojo es una especie monoica característica de las selvas tropicales, la cual se distribuye en la vertiente del Golfo de México (desde el sur de Tamaulipas y sureste de San Luis Potosí hasta la península de Yucatán), en la vertiente del Pacífico (desde Sinaloa hasta Guerrero) y en la depresión central y la costa de Chiapas (CONAFOR 2000). En Hidalgo se estima que el cedro rojo se encuentra distribuido en altitudes menores a los 2000 m, en áreas fragmentadas en la zona de barlovento, que comprende parte de la planicie Costera del Golfo Norte y los flancos al este de la Sierra Madre Oriental (SEMARNAT-UNAM 2001). La superficie de los tipos de vegetación con los que se asocia el cedro rojo cubre 2040.3 km², lo que equivale al 9,8% del territorio total del estado de Hidalgo. No obstante, la presencia de poblaciones nativas de la especie en el estado no está registrada, por lo que los mapas mostrados constituyen un modelo de distribución potencial, acorde con la vegetación asociada (Figura 2; Gómez *et al* 2007).

Es un árbol caducifolio de 20 hasta 45 m de altura, la copa es grande, redondeada, robusta y extendida o copa achatada. Hojas alternas de 15 a 50 cm, compuestas por 10 a 22 foliolos opuestos de 4.5 a 14 cm de largo por 2 a 4.5 cm de ancho, tronco recto y robusto, ramas ascendentes o arqueadas y gruesas. Corteza externa fisurada con las costillas

escamosas, pardo grisáceo a morena rojiza. Corteza interna rosada cambiando a pardo amarillenta, fibrosa y amarga con olor intenso similar al ajo. Las flores se encuentran en panículas terminales largas y sueltas de 15 a 30 **cm** de largo, el fruto es una infrutescencia hasta de 30 **cm** de largo, péndulas con capsulas de 2.5 a 5 **cm** de largo, sus semillas son aladas de 2 a 3 **cm** de largo incluyendo el ala, morenas adheridas al eje (Vázquez-Yanez *et al* 1999) (Figura 3). Las flores presentan características asociadas con entomofilia; se cree que los principales polinizadores son las abejas y las mariposas (Styles y Khosla 1976) y las polillas. Requiere mucha luz y frecuentemente aparece como especie pionera de rápido crecimiento en bosques secundarios (Pennington 1981). *Cedrela odorata* se encuentra listada como especie vulnerable en la lista roja de la **UICN** debido a la explotación a gran escala desde hace 200 años (**UICN** 2016). También se encuentra catalogada como una especie bajo protección especial de acuerdo con la norma mexicana **NOM-059-SEMARNAT-2010**. Cuenta con un plan de acción de **CITES** en el Anexo III (**CITES** 2016).

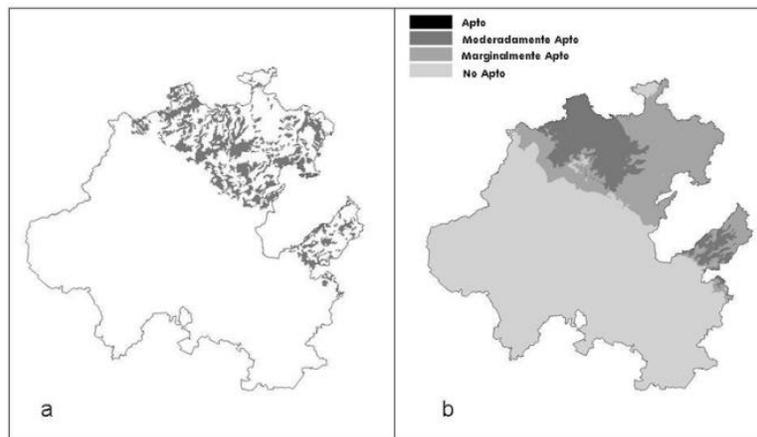


Figura 2. a) Distribución potencial de los tipos de vegetación con los que se asocia *Cedrela odorata*. b) Niveles de aptitud de distribución potencial actual (Tomado de Gómez *et al* 2007).



Figura 3. Fotografía de *Cedrela odorata* L., en la comunidad de Tamala (Tomada por Manuel Alejandro Macedo Villarreal) y esquema (Tomado de Smithsonian Institution, National Museum of Natural History, Department of Botany).

3 HIPÓTESIS

La extracción selectiva para aprovechamiento maderable de individuos de *Cedrela odorata* morfológicamente mejor conformados en condiciones naturales, cuya forma podría estar asociada con alelos específicos; disminuye la variabilidad genética de las poblaciones. Los esquemas de manejo actuales que incluyen la reforestación, obtienen semillas sólo de algunos individuos en un momento específico del tiempo. Por lo tanto, se espera que el manejo dirigido disminuya los niveles de variabilidad genética con respecto a la variación que existe en las poblaciones silvestres.

4 JUSTIFICACIÓN

Cedrela odorata es una especie de alto valor comercial que ha sufrido un aprovechamiento desmedido hasta hace menos de una década, momento en el que fue declarada bajo protección especial por las normas mexicanas. Este panorama condiciona la posibilidad de uso, dado el desconocimiento de las consecuencias que el aprovechamiento tuvo sobre el potencial evolutivo de la especie. La realización del presente estudio aportará información necesaria sobre el estado de conservación del acervo genético de las poblaciones de *Cedrela odorata* en el estado de Hidalgo, permitiendo un contraste con respecto a los sitios con mayor extracción respecto a sitios relativamente conservados, además de ubicar plantaciones y relacionarlas con las posibles zonas de origen para el germoplasma utilizado en los programas de reforestación. Esta información permitirá evaluar la eficacia de los programas de manejo de esta planta en México.

Los principales beneficiarios de los aportes del trabajo son las comunidades rurales que hacen uso de los recursos, los productores de bienes de transformación que utilizan la madera de cedro rojo y el mercado nacional de consumidores de este tipo de productos.

5 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la variabilidad genética de poblaciones con diferente manejo de *Cedrela odorata* en el estado de Hidalgo, mediante el uso de microsatélites; para determinar el efecto del manejo forestal sobre el acervo genético del recurso.

6 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de variabilidad genética, mediante indicadores como número efectivo de alelos por locus, polimorfismo, heterocigosis observada y esperada; para contrastar el efecto del manejo forestal sobre la diversidad genética de *C. odorata* e identificar posibles fuentes de variación.
- Establecer si existen relaciones o diferencias genéticas, mediante medidas de distancias, asignación de individuos y análisis de varianza molecular; para cuantificar los posibles cambios ocasionados por el manejo.
- Identificar pérdidas de variabilidad, mediante la comparación de la heterocigosis esperada bajo un modelo de equilibrio deriva-mutación, con respecto a la observada en las diferentes condiciones de manejo; para establecer la existencia y magnitud de cuellos de botella productos de la extracción-siembra.
- Proyectar el potencial de riesgo de las poblaciones bajo manejo y naturales, mediante una aproximación matricial múltiple; para determinar el potencial evolutivo de *C. odorata* en Hidalgo.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Sitios de estudio

El presente trabajo se realizó en la zona baja de la Sierra Hidalguense, en localidades donde ocurrieron actividades de reforestación y uso para *Cedrela odorata*. Las poblaciones bajo manejo corresponden a la localidad de Coyolapa, municipio de Atlapexco (21.04105 N, 98.34895 O, 493 **msnm**), y Tamala, municipio de Tepehuacan de Guerrero (21.00299 N, 98.79972O, 314 **msnm**), ambas con extracción actual ilegal desde hace al menos 7 años, momento en que la especie fue listada en la NOM-059 en la categoría de riesgo: "Protección Especial". Se cuenta con muestras de dos cultivos, uno ubicado en San Pedro, municipio de Huazalingo (20.949391 N, 98.529157 O, 401 **msnm**), con árboles sembrados hace 6 años con semillas provenientes de poblaciones naturales cercanas; el otro ubicado en Huextetitla, municipio de San Felipe Orizatlan (21.16627N, 98.58302 O, 737 **msnm**), con árboles sembrados hace aproximadamente 15 años, bajo un modelo distinto de aprovechamiento (sin datos de la fuente semillera). A su vez se identificaron dos poblaciones naturales en la comunidad de Chiconcoac, municipio de Lolotla (21.00632 N, 98.79852O, 327 **msnm**) y Coatenahuatl municipio de Huautla (21.07067 N, 98.28668 O 328**msnm**)(Figura 4).En cada localidad se colectó material biológico de al menos 30 árboles distintos (cuando fue factible), o la totalidad de los individuos. Las hojas se guardaron en bolsas herméticas con 1 **gr** de sílica y fueron colocadas en un refrigerador a -20°C hasta su uso. En total se colectaron 127 individuos de *C. odorata*, bajo el permiso de colecta SGPA/DGVS/06725/16 (Cuadro 2, Anexo11.1).

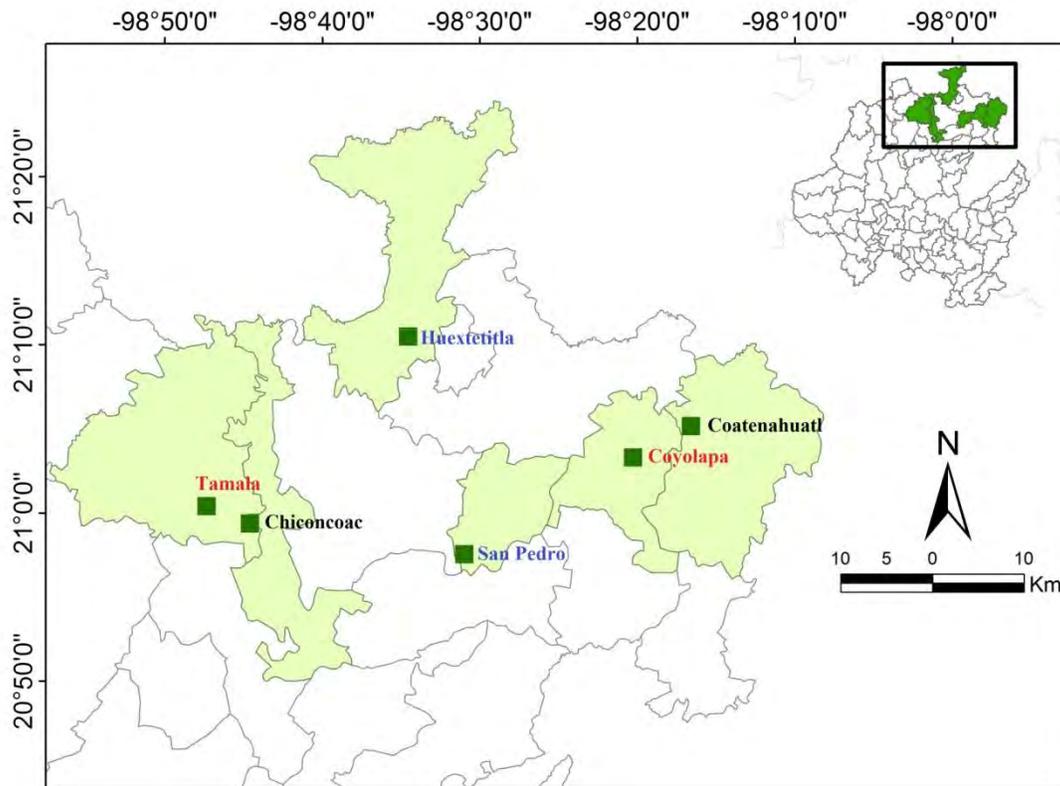


Figura 4. Ubicación geográfica de los sitios de estudio. Se identifican con color rojo las poblaciones bajo manejo, azul los cultivos y negro las poblaciones naturales (Mapa realizado por Montiel-Canales Gustavo).

Cuadro 2. Procedencia y cantidad de individuos colectados para el análisis genético de *Cedrela odorata*.

Sitio	Municipio	Condición	N	Latitud	Longitud	Altitud
Coyolapa	Atlapexco	Aprovechamiento	27	21° 2' 27.780"	98° 20' 56.220"	493
Huixtetitla	San Felipe Orizatlan	Cultivo	30	21° 9' 58.572"	98° 34' 58.872"	737
Chinconcoac	Lolotla	Natural	17	21° 0' 22.752"	98° 47' 54.672"	327
Tamala	Tepehuacan de Guerrero	Aprovechamiento	19	21° 0' 10.764"	98° 47' 58.992"	314
San Pedro	Huazalingo	Cultivo	19	20° 56' 57.808"	98° 31' 44.965"	401
Coatenahuatl	Huautla	Natural	15	21° 4' 14.412"	98° 17' 12.048"	328

7.2 Extracción de DNA

La extracción de **DNA** se realizó de acuerdo con el método modificado de Doyle y Doyle (1987 Anexo 11.2) con 0.5 **gr** de tejido vegetal, previamente desinfectado con etanol al 70%,

homogeneizado en mortero estéril adicionando nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino. Se agregó 1 ml del buffer de extracción (2% de **CTAB**, 1.42 M de **NaCl**, 20 mM de **EDTA**, 10 mM de tris-**HCL**, 2 % de **PVP** y 4 mM de ácido ascórbico) y se recuperó en un microtubo de 2ml. Se eliminó el sobrenadante y se re-suspendió con 600 µl del buffer **CTAB** y 20 µl de **RNAsa** (1 mg/ml) incubándose a 65°C durante 90 min, después se agregó 20 µl de **proteinasas K** (1 mg/ml), dejando en incubación a 65°C durante 30 min. Las muestras incubadas se centrifugaron por 10 min a 10,000 RPM, se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Se agregaron 600 µl de cloroformo:isoamilico (24:1) posteriormente se homogenizó perfectamente y se centrifugó durante 10 min a 10,000 RPM, se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo al cual se le agregó nuevamente 600 µl de cloroformo:isoamilico (24:1), esto se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 10,000 RPM, se tomó el sobrenadante y se colocó en un nuevo tubo al cual se le agregó 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el **DNA**, el cual se deja reposar 20 min a -20 °C. Se centrifugó durante 10 min a 12,000 RPM, se eliminó cuidadosamente el sobrenadante para evitar perder la pastilla de **DNA**, la cual fue lavada con 250 µl de etanol al 70 % y centrifugada durante 10 min a 14,000 RPM. Se eliminó el etanol cuidadosamente sin perder la pastilla de **DNA** y se repitió el lavado con etanol y la centrifugación. Una vez completamente seco el tubo se agregó 100 µl de agua ultra pura estéril.

A continuación se procedió a realizar la purificación del **DNA** agregando 300 µl de **dH₂O** y se mezcló, se agregó 400 µl de cloroformo:octanol (24:1), posteriormente se homogenizó y se centrifugó durante 10 min a 10,000 RPM, se tomó el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar la interfase, se transfirió a un nuevo microtubo donde se agregó 400 µl de

cloroformo:octanol (24:1) esto se homogenizó y se centrifugó durante 10 **min** a 10,000 **RPM**, se tomó el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar la interfase y se transfirió a un nuevo microtubo donde se agregó 65 μl de acetato de sodio (3 **M** a **pH** 5.2) y 600 μl de isopropanol y se dejó reposar 20 minutos a -20°C . Posteriormente se centrifugó a 14,000 **RPM** durante 15 **min**, se decantó teniendo cuidado de no mover la pastilla formada y se adicionó 250 μl de etanol absoluto frío y se centrifugó a 10,000 **RPM** por 7 **min**, se decantó nuevamente teniendo cuidado de no desechar la pastilla y se agregaron 250 μl de etanol 70% frío se centrifugó a 10,000 **RPM** por 5 **min**, se decantó tratando de eliminar la mayor cantidad de etanol sin desechar la pastilla, una vez seca, se agregaron 60 μl de **dH₂O** ultrapura estéril y las muestras se congelaron a -20°C para su posterior análisis. La integridad del **DNA** extraído se probó mediante electroforesis a 150 Volts por 1 hora, en gel de agarosa al 1.5%, revelado con Gel Red para posterior visualización en transiluminador **UV**. Las muestras extraídas fueron cuantificadas en un equipo nanodrop en el cual se analizó su concentración en $\text{ng}/\mu\text{l}$ (255.9 ± 218.3) y los parámetros de pureza 260/280 (1.7 ± 0.3) y 260/230 (1.4 ± 0.6).

7.3 Amplificación de microsatélites

Todos los microsatélites fueron amplificados usando 15 μl de volumen de reacción, consistentes en 3 μl de **DNA** de la muestra (100 $\text{ng}/\mu\text{l}$), 4.9 μl de **dH₂O**, 1.2 μl de **MgCl₂**, 1.2 μl de primer Forward y 1.2 μl de primer Reverse, 0.3 μl de **dNTPs**, 3 μl de Buffer de reacción y 0.2 μl de **Taq DNA**. Las reacciones se realizaron en un termociclador marca Thermo con las siguientes condiciones; 3.3 **min** a 94°C después 35 ciclos de 0.35 **min** a 94°C , 0.45 **min** a 48.8°C para el marcador Ced2, 54°C para los marcadores Ced18, Ced41, Ced44, Ced54,

Ced61a, Ced65 y 47°C para los marcadores Ced95 y Ced131; 0.35 a 72 °C, finalmente 72°C por 5 min. Los productos de **PCR** fueron separados en un gel de poliacrilamida al 15% y visualizados en un trans-iluminador **UV** y se utilizó el **DNA ladder** 100bp marca promega. Los iniciadores usados fueron propuestos por Hernández *et al* (2008) y sus características se especifican en el Cuadro 3. Estos geles fueron comparados con acrilamida desnaturalizante adicionada con urea para establecer un patrón de bandeo estandarizado (Anexo 11.3).

Cuadro 3. Secuencia y caracterización de los nueve marcadores microsatélites utilizados para la evaluación genética de *Cedrela odorata* en diferentes condiciones de aprovechamiento.

Locus	Arreglo	Secuencias (5'-3')	Tamaño de los alelos / pb	Temperatura de alineamiento	Número de alelos
Ced2	((GA)20)	F:TTTGCTTTGAGAAACCTTGT R:AACTTTCGAATTGGTTAAGG	123-185	47.8	12
Ced18	(GA)23	F:CAAAGACCAAGATTTGATGC R:ACTATGGGTGGCACAACTAC	122-157	52	13
Ced41	(TC)18	F:TCATTCTTGGATCCTGCTAT R:GTGGGAAAGATTGTGAAGAA	119-175	52	12
Ced44	(TG)14 (AG)17	F:ACTCCATTAACAGCCATGAA R:ATTTTCATTCCCTTTAGCC	152-234	52	17
Ced54	(GA)15 (AG)6 G(GA)5	F:GATCTCACCCACTTGAAAAA R:GTCATATTTGAGAGGCATT	159-244	52	15
Ced61a	(TG)10	F:CAATCAAACCAAAAAATGGAT R:GCAAATTAACCAGAAAAACG	224-278	52	10
Ced65	(GA)7 (CA)14	F:GAGTGAGAAGAAGAATCGTGATAGC R:GAGGTTCGATCAGGTCTTGG	163-202	52	9
Ced95	(CT)17 (AC)13	F:ATTTTCATTCCCTTTAGCC R:TTATCATCTCCCTCACTCCA	178-232	47	12
Ced131	(CT)16	F:CTCGTAATAATCCATTCCA R:GGAGATATTTTGGGGTTTT	83-121	47	10
					110

7.4 Análisis de datos

Los geles obtenidos para la visualización de los amplicones se analizaron utilizando el programa GelAnalyzer (Lazar y Lazar 2010) capturando en una hoja de cálculo la longitud e intensidad de la o las bandas de cada individuo, considerando el tamaño molecular ponderado con relación a un marcador de peso molecular conocido. La matriz de frecuencias alélicas

fue corregida de acuerdo con la propuesta de eliminación de alelos nulos o repetidos (Chybicki y Burczyk 2009).

Se calcularon las frecuencias génicas (alélicas y genotípicas) de todas las poblaciones en cuestión, se determinó el promedio de muestras amplificadas por locus/población (**N**), el promedio de alelos por locus/población (**A**), el número efectivo de alelos por locus/población (**Ne**), el índice informativo para cada iniciador (**I**), las heterocigosis observadas y esperadas (**H_O** y **H_E** respectivamente) y el coeficiente de fijación ($f = 1 - \frac{H_O}{H_E}$). Con estos datos se determinó si las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weimberg (**EHW**, Anexo 11.4), de acuerdo con las diferencias significativas entre las frecuencias observadas y esperadas, utilizando el programa GenAlEx v.6.5 (Pekall y Smouse 2012), el cual considera una prueba de χ^2 para esta comparación. Además, se estableció la cantidad de alelos exclusivos por población, medida indirecta de la fijación por deriva génica.

Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (**AMOVA**) basado en los indicadores **F_{ST}** (Excoffier *et al* 1992), el valor de corte para la significancia fue corregido por el método de Bonferroni, que considera el número total de correlaciones posibles como un factor de aleatorización. Con este indicador de diferenciación se calcularon las distancias corregidas de Nei (Takezaki y Nei 1996) y el número de individuos migrantes por generación entre poblaciones pareadas ($N_m = \frac{1}{4} [\frac{1}{F_{ST}} - 1]$). Las distancias obtenidas con cada iniciador se utilizaron para construir un árbol de agrupamiento bajo el modelo de unión al vecino más cercano (*Neighbor-Joining* **N-J**), ya que permite visualizar la distancia ponderada entre

grupos asociada a la longitud de las ramas, para ello se utilizó el programa Past v. 2.17 (Hammer *et al* 2001). También se realizó un análisis de asignación de individuos por grupo basado en permutaciones de Monte Carlo, considerando 50,000 iteraciones y 50,000 burning, bajo un modelo aditivo que considera *a priori* la identidad del grupo de procedencia (Falush *et al* 2007). Este análisis se realizó con inferencias de 2 a 20 grupos, en 10 iteraciones; para maximizar la detección de subestructura al interior de las poblaciones, estableciendo el límite de asignación adecuado de acuerdo con la menor varianza acumulada, para ello se utilizó el método gráfico propuesto por Evanno *et al* (2005), mediante el software STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012). Estos análisis se realizaron con el programa STRUCTURE v 5.4 (Pritchard *et al* 2000), se corrigieron al promedio de las 10 iteraciones mediante el programa CLUMPP v.1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg 2007) y se visualizaron con la aplicación Distruct v.1.1 (Rosenberg 2004). Además, se realizó una prueba de Mantel considerando la matriz de distancias genéticas de Nei corregida con respecto a las distancias geográficas entre sitios, la prueba se realizó con 999 permutaciones en el programa TFGA v 1.3 (Miller 1997) Se determinó la disminución reciente en el tamaño efectivo poblacional ponderando la heterocigosis con relación a los valores esperados por un modelo de equilibrio deriva-mutación, bajo el supuesto de alelos infinitos (**I.A.M**), para ello se utilizó el programa Bottleneck 1.2.02 (Cournuet *et al* 1997-1999).

Finalmente, se evaluó el potencial de riesgo para las condiciones considerando la heterocigosis calculada bajo el efecto de la f y de la adecuación w . Para ello se realizó una iteración de 10,000 pasos considerando una aleatorización del coeficiente de endogamia al interior de las condiciones (dos valores) y recalculando la frecuencia de los

heterocigotos con la fórmula $H_s = H_o - (H_o * f)$. El resultado obtenido, que representa las proporciones ideales de H_o (H_s = heterocigosis estandarizada) en cada condición después de sufrir una depuración por endogamia; fue utilizado para calcular un coeficiente de adecuación por condición (w_{ij}) mediante la fórmula $w = H_s/H_o$, y después se ponderó respecto al valor mayor, que coincidió con la condición natural.

8 RESULTADOS

8.1 Variación genética

La variación genética de las poblaciones de *Cedrela odorata* analizadas corresponden en tamaño en pares de bases y en número de alelos por locus con trabajos previos (Hernández *et al*2008) (Cuadro 4). La variación genética en las poblaciones resulta alta, en comparación con otras plantas leñosas, con un promedio de **Ho** = 0.87 ± 0.02 y de **He** = 0.82 ± 0.01 . Sin embargo, por condición; la variación no se distribuye de manera homogénea, encontrando mayor variación en los cultivos (**Ho** = 0.88 ± 0.01 , **He** = 0.83 ± 0.02) seguidos de las poblaciones naturales (**Ho** = 0.88 ± 0.07 , **He** = 0.81 ± 0.01). Los valores más bajos de heterocigosis se observaron en las poblaciones con extracción (**Ho** = 0.84 ± 0.03 , **He** = 0.82 ± 0.02). En cuanto al coeficiente de fijación, las poblaciones naturales se encuentran en equilibrio de Hardy-Weimberg con valores asociados a exogamia, aunque con varianza elevada por lo que resultan no ser significativos ($F = -0.1 \pm 0.11$, **EHW** = ns). Los cultivos presentan exogamia ($F = -0.07 \pm 0.05$), aunque en el caso del cultivo joven (San Pedro) no se aleja del **EHW**, pero en el cultivo viejo (Huextetitla) sí resulta significativo. En cuanto a las poblaciones bajo manejo, la exogamia ($F = -0.2 \pm 0.07$, **EHW** $p < 0.001$) resulta afectar significativamente el **EHW** en ambos casos (Cuadro 4). En todos los grupos analizados el polimorfismo fue de 100 %.

Cuadro 4. Descriptores de la variación genética por población. N: Número de individuos analizados, Na: Número de alelos por locus, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosis observada, He: Heterocigosis esperada, F: Índice de fijación, AP: Número de Alelos Privados por Población, EHW: Equilibrio de Hardy-Weimberg, Con: condición, Nat: Natural, Cul: Cultivo, Apr: Aprovechamiento.

Con	Población	N	Na	Ne	I	Ho	He	F	AP	EHW
Nat	Coatenahuatl	16	8 ± 0.53	5.58 ± 0.35	1.86 ± 0.06	0.83 ± 0.04	0.82 ± 0.01	-0.02 ± 0.05	4	ns
Cul	San Pedro	19	7.89 ± 0.39	5.55 ± 0.42	1.82 ± 0.07	0.89 ± 0.02	0.81 ± 0.02	-0.1 ± 0.03	1	ns
Apr	Tamala	18	8.44 ± 0.84	5.43 ± 0.38	1.84 ± 0.08	0.86 ± 0.06	0.81 ± 0.01	-0.07 ± 0.08	7	***
Nat	Chinconcoac	17	7.44 ± 0.44	5.16 ± 0.34	1.77 ± 0.06	0.93 ± 0.02	0.8 ± 0.01	-0.17 ± 0.03	0	ns
Apr	Coyolapa	27	9.33 ± 0.37	6.35 ± 0.4	1.97 ± 0.05	0.82 ± 0.04	0.84 ± 0.01	0.02 ± 0.06	2	***
Cul	Huextetitla	29	9.78 ± 0.81	6.68 ± 0.55	2.01 ± 0.08	0.87 ± 0.03	0.84 ± 0.01	-0.034 ± 0.03	10	***
	Nat	16.5 ± 0.71	7.72 ± 0.39	5.37 ± 0.3	1.82 ± 0.06	0.88 ± 0.07	0.81 ± 0.01	-0.1 ± 0.11	4 ± 2.83	
	Cul	24 ± 7.07	8.83 ± 1.34	6.11 ± 0.8	1.92 ± 0.13	0.88 ± 0.01	0.83 ± 0.02	-0.07 ± 0.05	5.5 ± 6.36	
	Apr	22 ± 6.36	8.89 ± 0.63	5.89 ± 0.65	1.91 ± 0.09	0.84 ± 0.03	0.82 ± 0.02	-0.02 ± 0.07	4.5 ± 3.54	
	Total	21 ± 0.7	8.48 ± 0.26	5.79 ± 0.18	1.88 ± 0.03	0.87 ± 0.02	0.82 ± 0.01	-0.06 ± 0.02	24	

ns: no significativo; *** $p < 0.001$ de acuerdo con la prueba de Chi cuadrada.

8.2 Estructura genética

El análisis de varianza molecular mostró diferencias significativas entre las poblaciones evaluadas ($F_{st(5,251)} = 0.046$, $p < 0.001$), distribuidas principalmente dentro de las localidades (95 % de la variación). Lo que corresponde con un elevado flujo génico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Matriz pareada de valores F_{st} (bajo la diagonal) y Número efectivo de migrantes por generación (N_m) (sobre la diagonal). *: diferencias significativas entre poblaciones, corregidas por el método de Bonferroni.

Población	Coatenahuatl	San Pedro	Tamala	Chiconcoac	Coyolapa	Huextetitla
Coatenahuatl	-	5.232*	4.949*	5.419*	7.564*	3.416*
San Pedro	0.046	-	5.010*	20.279	7.982*	4.456*
Tamala	0.048	0.048	-	11.037	5.201*	3.187*
Chiconcoac	0.044	0.012	0.022	-	6.944*	4.916*
Coyolapa	0.032	0.030	0.046	0.035	-	4.451*
Huextetitla	0.068	0.053	0.073	0.048	0.053	-

Las poblaciones conforman tres grupos con alta similitud en las frecuencias alélicas y divergencia seriada desde el cluster central (Chiconcoac-Tamala < 0.01), con una siguiente ramificación de divergencia del cluster superior (Coatenahuatl-Coyolapa < 0.2) y una divergencia final en el cluster inferior (San Pedro-Huextetitla < 0.3), este último conformado por los cultivos, mismos que a su vez presentan una divergencia elevada (< 0.4) por lo que el cultivo viejo (Huextetitla) es el de mayor disimilitud en las frecuencias alélicas (Figura 5).

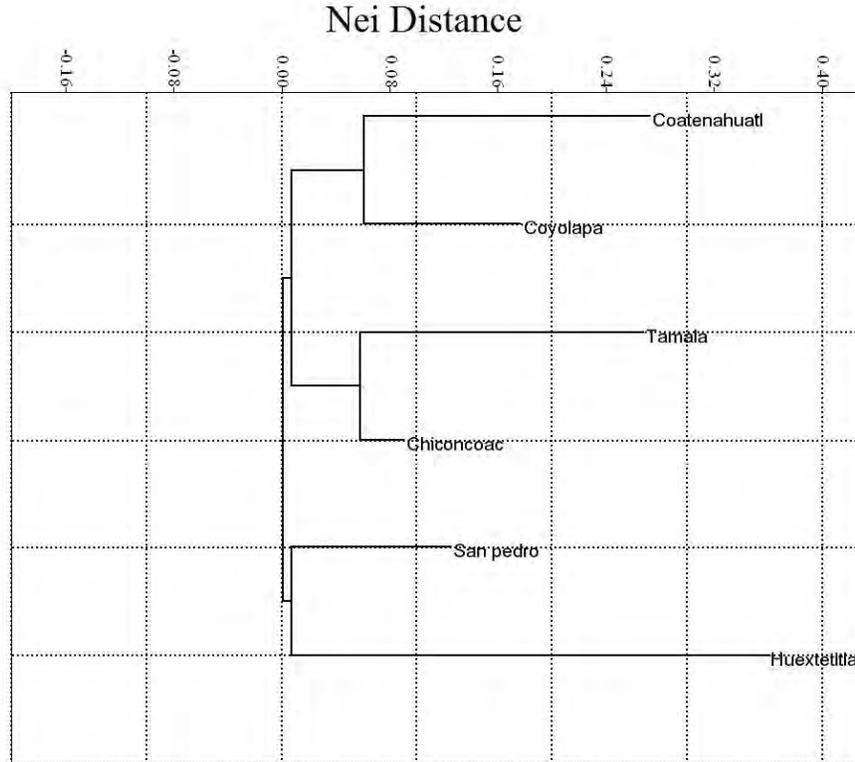


Figura 5. Árbol de agrupamiento basado en las distancias corregidas de Nei (Takezaki y Nei 1996) agrupadas por el método de Neighbor-Joining.

El análisis de asignación bayesiana mostró que el número más probable de grupos genéticos es de 10 distribuidos de manera diferencial entre las localidades (Figura 6a). La mayor riqueza genética se encuentra en Chiconcoac seguida de Coatenahuatl; ambas poblaciones naturales con una adecuada representatividad. Las poblaciones de Tamala y Coyolapa, ambas con extracción de madera; también cuentan con alta representatividad, pero con cambios en la composición. Finalmente, ambos cultivos (San Pedro y Huextetilla), tienen

una notable fijación en la variación genética además que en Huextetitla se pierde un grupo genético (Cultivo Viejo) (Figura 6b).

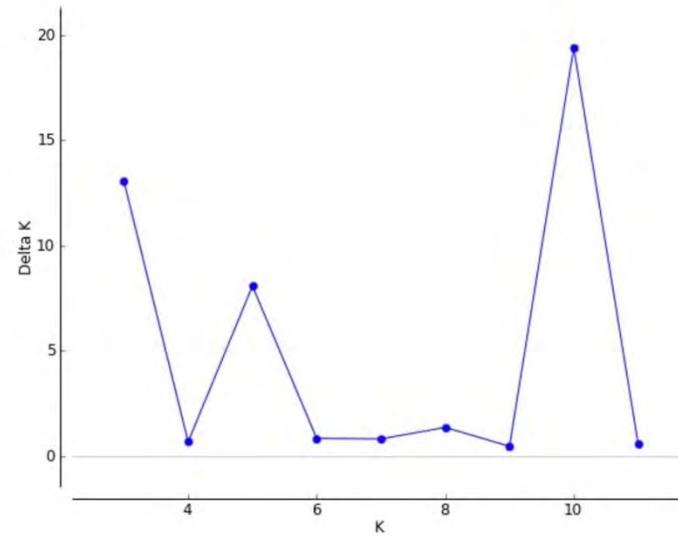
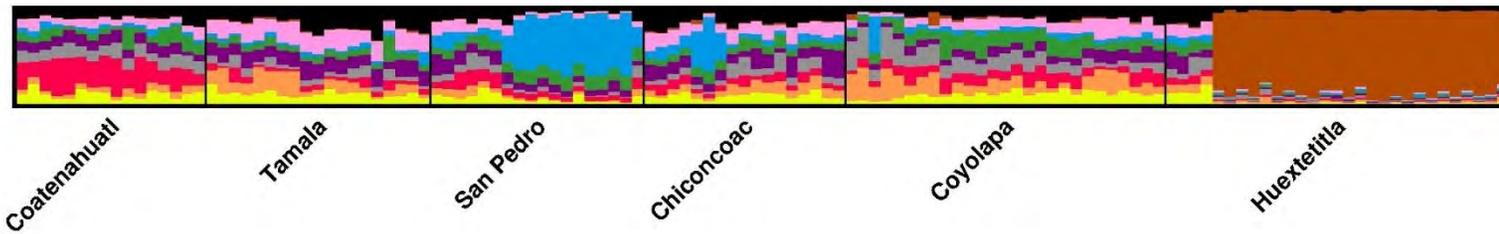
a**b**

Figura 6. a) Determinación de los grupos genéticos con base en la propuesta gráfica de Evanno *et al*(2005). b) Modelo de asignación promedio de los árboles de *Cedrela odorata*, de acuerdo con los grupos genéticos calculados, en las distintas procedencias.

Los resultados de la prueba de Mantel mostraron una correspondencia con el agrupamiento de N-J, donde las poblaciones más cercanas resultan ser las naturales y las sometidas a procesos de extracción, por lo que existe una conectividad geográfica entre Coyolapa-Coatenahuatl y entre Chiconcoac-Tamala ($r = 0.949$, $p < 0.05$)(Figura 7). Sin embargo, la correlación se pierde con respecto a Huextetitla, por lo que la distancia genética de ese cultivo no corresponde a la distancia geográfica, lo que sugiere su origen diferente.

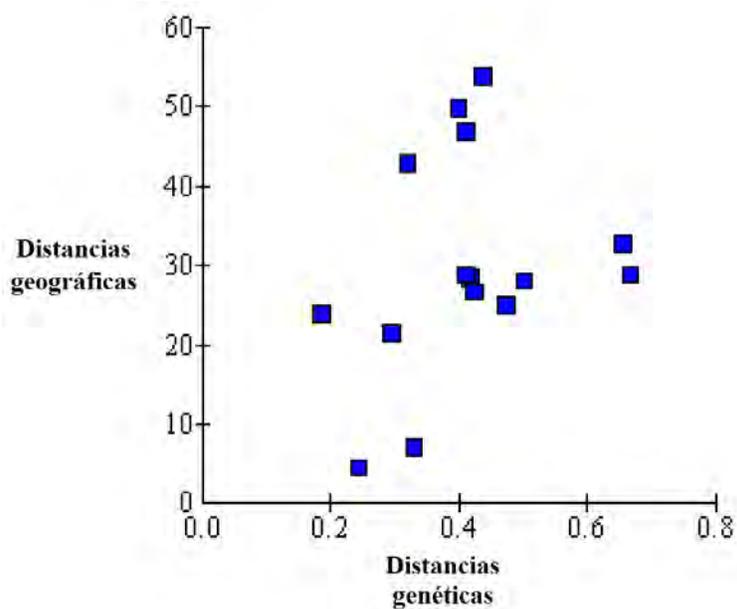


Figura 7. Correlación por permutación de Mantel entre las distancias genéticas de Nei y geográficas (km) de las poblaciones Hidalguenses de *Cedrela odorata*.

8.3 Cuellos de botella

Los análisis de cuello de botella mostraron que todas las poblaciones se han reducido recientemente, al presentar el 100% de los loci evaluados con exceso de heterocigosis calculada bajo el modelo de equilibrio deriva-mutación (EDM). Sin embargo, la cantidad de

loci con cambios en la frecuencia de heterocigotos esperados bajo el modelo de islas infinitas (**Heq**) es diferente en cada localidad; por lo que la magnitud del cuello de botella también es distinta, en orden ascendente se observa: Tamala (**Apr**), Chinconcoac (**Nat**), Coatenahuatl (**Nat**), San Pedro (**Cul**), Coyolapa (**Apr**) y Huextetitla (**Cul**) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Descripción de los cuellos de botella identificados en las poblaciones de *Cedrela odorata* del estado de Hidalgo. Locus \neq DM: Locus con diferencias significativas del modelo de equilibrio deriva-mutación, Heq: heterocigosis calculada bajo el modelo de equilibrio deriva-mutación, LD: Loci con deficiencia de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas, LE: Loci con exceso de heterocigosis calculados por la permutación bajo el supuesto de islas infinitas, H: Valor obtenido de la prueba de Wilcoxon, p: Probabilidad de significancia, CB: magnitud del cuello de botella.

Condición	Población	Locus \neq DM	Heq	LD	LE	H	p	CB
Nat	Coatenahuatl	Ced2	0.786	0	9	2.959	0.00155	**
		Ced54	0.885					
		Ced61a	0.839					
		Ced95	0.863					
Cul	San Pedro	Ced18	0.872	0	9	3.123	0.00089	***
		Ced41	0.885					
		Ced61a	0.873					
		Ced65	0.862					
		Ced95	0.856					
Apr	Tamala	Ced65	0.797	0	9	2.851	0.002	**
		Ced95	0.860					
Nat	Chinconcoac	Ced2	0.807	0	9	2.889	0.0019	**
		Ced18	0.881					
		Ced61a	0.87					
		Ced95	0.841					
		Ced131	0.838					
Apr	Coyolapa	Ced2	0.863	0	9	3.441	0.00029	***
		Ced18	0.887					
		Ced41	0.878					
		Ced65	0.852					
		Ced95	0.895					
		Ced131	0.848					
Cul	Huextetitla	Ced2	0.857	0	9	3.698	0.00011	***
		Ced18	0.909					
		Ced54	0.836					
		Ced61a	0.877					

Ced65	0.834
Ced95	0.882
Ced131	0.794

*. $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La proyección bajo un modelo de endogamia mostro una heterocigosis estandarizada (Hs) por permutación de 0.972 ± 0.073 para la condición Natural, 0.946 ± 0.026 para los cultivos y de 0.857 ± 0.041 para las poblaciones bajo aprovechamiento. De acuerdo con los rangos y la propuesta de Markov que dice, las diferencias en los intervalos son un reflejo de la exclusión de los casos entre grupos de variables iteradas (Gamerman y Lopes 2006); existen diferencias significativas entre la heterocigosis estandarizada de las poblaciones naturales con respecto a las poblaciones bajo manejo. No existen diferencias de los cultivos con respecto a las otras dos condiciones. Esto también se refleja en el coeficiente de adecuación el que indica una pérdida, con respecto a la adecuación de las poblaciones naturales; del 2.7% para el cultivo y del 7.7% para la población bajo aprovechamiento (Figura 8).

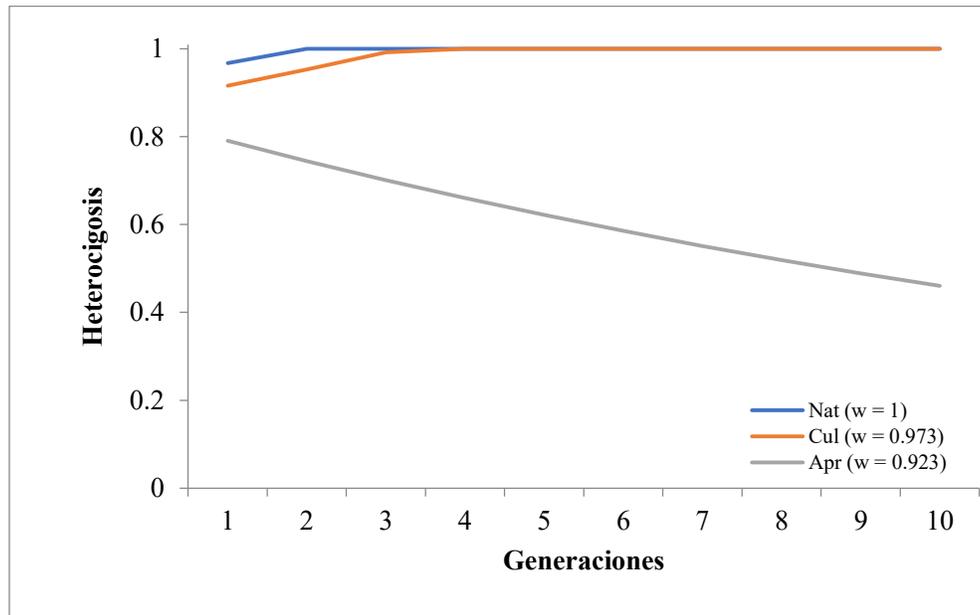


Figura 8. Proyección a diez generaciones de la frecuencia de genotipos heterocigotos en las diferentes condiciones de aprovechamiento, considerando la pérdida de adecuación y la endogamia simultáneamente bajo la fórmula: $Ho_t = [Ho_i - (Ho_i * f)] * w_{ij}$.

9 DISCUSIÓN

Mediante el uso de microsatélites, específicos para la especie *Cedrela odorata*, fue posible evaluar el efecto del manejo forestal sobre el acervo genético del cedro rojo en Hidalgo. En general, el principal efecto fue la pérdida de variabilidad genética en el cultivo con una base genética pobre (Huextetitla), incrementando su diferenciación con respecto al resto de las poblaciones. Este cultivo proviene de fuentes semilleras desconocidas que podrían no pertenecer al estado, haciéndolas disímiles, susceptibles y de baja calidad, por lo que no serían una buena manera de abordar el manejo.

Por otro lado, el cultivo con fuentes semilleras múltiples y origen autóctono (San Pedro), tienen mayor diversidad de lo esperado, aun cuando es posible identificar un efecto

fundador asociado a la homogeneidad de origen, que incrementa la cantidad de heterocigotos de manera temporal por error de muestreo (Cournuet *et al* 1997-1999; Castilla *et al* 2016), acercando las frecuencias genotípicas al equilibrio de Hardy-Weimberg por un efecto Wahlund (Chybicki y Burkzyk 2009). Esta estrategia resulta mejor para la conservación de la diversidad genética, siempre que se tenga un ingreso constante de individuos procedentes de la fuente original para no perder los niveles de variación (Flores *et al* 2007).

En cuanto a las poblaciones bajo manejo, es destacable la relación genética con respecto a sus pares geográficos naturales, manteniendo una relación genética fuerte y correlacionada con la distancia. Sin embargo, esta estructura de conectividad no se mantiene pues se pierden genotipos por extracción que generan un cuello de botella fuerte (Cournuet *et al* 1997-1999), particularmente en la población con mayor intensidad de extracción (Tamala); disminuyendo significativamente la adecuación poblacional en estas condiciones.

Por lo anterior, los análisis permitieron hacer una aproximación del potencial de riesgo para las condiciones de manejo de la especie; mostrando que la interacción de la endogamia y la selección dirigida a ciertos fenotipos pone en riesgo a la especie en el estado de Hidalgo, por lo que se debe evitar la extracción y fomentar los cultivos, siempre que se cuente con múltiples fuentes semilleras autóctonas, obteniendo beneficios a mediano y largo plazo.

9.1 Variación genética

Los altos niveles de heterocigosis presentes en las poblaciones de *Cedrela odorata* del estado de Hidalgo, concuerdan con lo esperado en especies de árboles tropicales con exocruza obligada (Hamrick *et al* 1979), los cuales fueron en promedio de $H_o = 0.87 \pm 0.02$ y de $H_e = 0.82 \pm 0.01$. Sin embargo, una vez que se analizan dependiendo del tipo de aprovechamiento, existe una diferencia apreciable en las mismas. Las poblaciones con menor valor de heterocigosis fueron las que presentaron extracción (0.84 ± 0.03) y no hay diferencias aparentes entre los cultivos y las poblaciones naturales (0.88 ± 0.07 , 0.88 ± 0.01 respectivamente). No obstante, la desviación estándar sugiere que los cultivos son más estables, lo cual resulta obvio puesto que tienen fuentes de variación únicas generacionalmente hablando (Frankham *et al* 2002). A nivel particular, la población con menor heterocigosis es Coyolapa con $H_o = 0.82 \pm 0.04$ y de $H_e = 0.84 \pm 0.01$, la cual se encuentra bajo manejo. En contraste, la población con la mayor heterocigosis es Chiconcoac de 0.93 ± 0.02 y de $H_e = 0.8 \pm 0.01$, la cual se considera Natural. El resto de las poblaciones tienen valores intermedios y heterogéneos, por lo que no sería posible identificar una constante atribuible a la condición de manejo. Al respecto, un atributo que sí permite identificar una constante es el equilibrio de Hardy-Weimberg encontrado en las poblaciones naturales, por lo que se infiere una fuente de variación genética múltiple y constante en el tiempo (altos niveles de exogamia) que mantienen la variabilidad genética a lo largo del tiempo, tal como se esperaría en una especie de exocruza polinizada por viento (Jump y Peñuelas 2006). El mismo efecto, pero provocado por el manejo de las fuentes semilleras, se presenta en el cultivo de San Pedro.

La extracción hace más heterogéneas las respuestas ya que en un caso (Tamala) hay exceso de heterocigos y exogamia, mientras que en Coyolapa pasa lo contrario. Tal nivel de variación puede darse ante condiciones ambientales adversas y cambiantes, producto de las actividades antropogénicas (Balvanera y Aguirre 2006, Krishnadas *et al* 2016, Popradit *et al* 2015, Williams-Linera y Lorea 2009).

9.2 Estructura genética

Se puede apreciar un flujo genético elevado dentro de las poblaciones, lo cual es esperado debido a la biología reproductiva de *C. odorata* (Muellner *et al* 2010). Al utilizar los datos obtenidos del AMOVA para agrupar las poblaciones bajo el modelo de unión al vecino más cercano (Neighbor-Joining), fue posible observar el agrupamiento asociado a la distancia (Coatenahuatl-Coyolapa, separadas por 7.11 km; Chiconcoac-Tamala, separadas por 4.5 km), lo que también se aprecia en la prueba de Mantel (Figura 7). Sin embargo, Huextetitla y San Pedro, ambos cultivos; tienen una divergencia elevada y son agrupados debido a la disimilitud en los mismos. En otras especies tropicales con exocruza es posible identificar patrones de aislamiento por distancia o "Stepping-Stone" similares al encontrado, por ejemplo, en *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al* 2001) y en *Aucoumea klaineana* (Born *et al* 2008), en ambos árboles tropicales; existe un aislamiento genético asociado a la distancia y a la fragmentación del hábitat. Sin embargo, los cultivos no siguen ningún patrón geográfico, a menos que tengan procedencias nativas, tal es el caso de San Pedro.

Los 10 grupos genéticos identificados por el análisis de asignación son muchos con respecto a otras especies arbóreas y de larga vida (Parchman *et al* 2011; Yang *et al*

2015;Oshawa *et al* 2011). Esta variación obedece a familias genéticas múltiples dentro de las poblaciones, que magnifican la variación intra *versus* inter poblacional (95 vs 5 %, en nuestro caso). La mayor variación intrapoblacional, expresada por riqueza de grupos (10 de 10); se encontró en Tamala y Coyolapa, ambas bajo aprovechamiento. No obstante, la frecuencia de los grupos es bastante homogénea, sin destacar alguno en particular. En contraste, las poblaciones naturales, aún cuanto tienen también una riqueza importante en grupos genéticos (9 de 10); destacan por mayor frecuencia algunos de ellos, asociados de manera diferencial a cada población. En otras palabras, en las poblaciones naturales hay muchos grupos, algunos abundantes pero diferentes entre ellas (Nishimura *et al* 2011; Geraghty *et al* 2013; Galván-Hernández *et al* 2015;Castilla *et al* 2016).

Los cultivos son dos casos distintos, San Pedro tiene una representación importante de los subgrupos (9 de 10), sin embargo, uno de ellos sobresale incluso más que en las condiciones naturales. La riqueza indica que para este cultivo se utilizaron semillas locales, similares o cercanas a la población de Chiconcoac, aunque la sobre representatividad de un grupo particular también indica que se sembraron individuos emparentados. Por el contrario, Huextetitla presenta un dominio total de un subgrupo y una extremadamente baja representatividad del resto, esta homogeneidad indica la siembra de hermanos procedentes de un solo parental. Además, el grupo sobre-representado en el cultivo de Huextetitla, es el menos frecuente en el resto de las poblaciones, lo que sugiere una procedencia diferente y externa a la Huasteca Hidalguense. Estas dos poblaciones ejemplifican la manera en que se llevan a cabo los programas de siembra de *C. odorata*. Según los respectivos propietarios de los predios de cultivo, los arboles fueron otorgados por programas de gobierno en diferentes

periodos, por lo que proceden de programas con normativas distintas, e incluso diferentes dependencias gubernamentales encargadas de la gestión, como por ejemplo SAGARPA y CONAFOR.

9.3 Cuellos de botella

El análisis de cuello de botella mostró que todas las poblaciones presentan reducciones recientes en el tamaño poblacional. Sin embargo, de los nueve loci analizados; el exceso de heterócigos con respecto al modelo de equilibrio deriva-mutación varía entre dos (Tamala) y siete (Huextetitla). Esta cantidad de loci afectados se encuentra relacionado directamente con la intensidad de la reducción poblacional. Los cultivos, así como la población bajo aprovechamiento de Coyalapa resultan presentar el cuello de botella más intenso. En el primer caso, es obvio que el efecto en los cultivos se debe a la fuente de variación reducida; por lo que más que un cuello de botella se trata de un efecto fundador. Sin embargo, en Coyalapa, el efecto observado es producto de la extracción masiva e indiscriminada de individuos; por lo que el efecto del aprovechamiento resulta en una reducción sostenida e indiscriminada del tamaño poblacional (Young *et al* 1996; Lengkeek *et al* 2004; Jump *et al* 2006; Davies *et al* 2010).

9.4 Proyección y aprovechamiento

El potencial de riesgo para una especie depende tanto de factores intrínsecos (e.g.: densidad poblacional, tasa de crecimiento poblacional, sistema reproductivo, entre otras), como extrínsecos (e.g.: costo de extracción, mercado, infraestructura, entre otros) (Mace *et al* 2008).

Bajo este contexto *Cedrela odorata* podría considerarse una especie de riesgo elevado (NOM-059), de allí la urgencia de este tipo de trabajos y la necesidad de incluirla como especie bajo protección especial. Destacan como amenazas, el mercado de su madera, la longevidad de la especie que retrasa el alcanzar la talla comercial y la alta mortalidad de plántulas, tanto en campo como en cultivo. Los resultados obtenidos avalan además el efecto negativo de la extracción sobre las poblaciones y la homogeneidad que se fomentó indiscriminadamente por cultivos mal planteados.

Las políticas actuales para la proyección futura del manejo forestal (CONAFOR 2014), muestran una mejor planeación para la reforestación a partir de cultivos con fuentes múltiples pero autóctonas, lo cual es acorde con los resultados del presente estudio. Sin embargo, para esta especie en particular no hay planes de reforestación, ni estatales ni nacionales; asumiendo que la regeneración natural es suficiente para la recuperación de las poblaciones que fueron sometidas a extracción y compensando la producción con cultivos. Sugerimos:

- Tomar en cuenta los aspectos genéticos de la especie en los planes de manejo estatales y federales, ya que estos nos dan información importante para el éxito de los programas.
- Utilizar fuentes variadas de semillas locales para los proyectos de siembra de la especie, y dar un seguimiento adecuado a los mismos.
- Replantear la regulación de la extracción, pues resulta ser la actividad que más compromete la adecuación de la especie.

10 BIBLIOGRAFÍA

- Acosta-Hernández, C. C.; Luna-Rodríguez, M.; Octavio-Aguilar, P.; Morales-Romero, Z.; Galindo-Gonzales, J.; Noa-Carranza, J. C., Vázquez-Torres, S. M. y L. G. Iglesias-Andreu. 2011. Efecto del aprovechamiento forestal sobre la variación morfológica de *Juglans pyriformis* LIEBM. Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente 17(3): 379-388.
- Alba-Landa, J. 2005. Manejo de recursos genéticos forestales. Manual de prácticas. Instituto de Genética Forestal. 17 pp.
- Alderete-Chávez, A. L.; De la Cruz-Landero, N. y J. E González de la Torre. 2005. Variación de semillas en *Cedrela odorata* L. procedentes de los estados de Campeche y Tabasco, México. Foresta Veracruzana 7(2): 41-44.
- Balvanera, P y E. Aguirre. 2006. Tree diversity, environmental heterogeneity, and productivity in a Mexican tropical dry forest. Biotropica 38(4): 479-491.
- Bawa, K. S.; Bullock, S. H.; Perry, D. R.; Covervillerre, R. E. y M. H. Grayum. 1995. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II. Pollination systems. American Journal of Botany 72: 346-356.
- Born, C.; Hardy, O. J.; Chevallier, M. H.; Ossari, S.; Atteke, C., Wickings, J. y M. Hossaert-Mckey. 2008. Small-scale spatial genetic structure in the Central African rainforest tree species *Aucoumea klaineana*; a stepwise approach to infer the impact of limited gene dispersal, population history and habitat fragmentation. Molecular Ecology 17(8): 2041-2050.
- Calva-Soto, K. y J. Ramos-Frías. 2014. Variabilidad genética y restauración ecológica. Herreriana Año 10 No 1: 15-18.
- Castilla, A. R.; Pope N.; Jaffe, R. y S. Jha. 2016. Elevation, not deforestation, promotes genetic differentiation in a pioneer tropical tree. PLoS ONE 11(6): e0156694. doi:10.1371/journal.pone.0156694
- Cavers, S.; Navarro, C. y A. J. Lowe. 2003. Chloroplast DNA Phylogeography colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L. (Meiliaceae) in Mesoamerica. Molecular Ecology 12: 1451-1460.
- Chybicki, I. J. y J. Burczyk. 2009. Simultaneous estimation of null alleles and inbreeding coefficients. Journal of Heredity 100: 106-113.
- CITES. 2016. *Cedrela odorata* L. Convención sobre el comercio internacional de especies amenazadas de Fauna y flora silvestre. Apéndice III. <https://cites.org/esp/node/29983> > Downloaded 10 November 2016.
- Collevatti, R. G.; Grattapaglia, D. y J. D. Hay. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, base on variability at microsatellite loci. Molecular Ecology 10(2): 349-356.
- CONAFOR 2014 Programa Nacional Forestal 2014-2018 https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/25918/3.3.2.5._Programa_Nacional_Forestal_PRONAFOR_7oct15.pdf Downloaded 28 de septiembre 2017
- CONAFOR. 2000. Ficha técnica de *Cedrela odorata* L. Comisión Nacional Forestal, México. 6pp.

- Cournuet, J. M.; Luikart, G. y S. Piry. 1997-1999. Bottleneck software version 1.2.02 (16.II.99) INRA. All rights reserved.
- Davies, S. J.; Cavers, S.; Finegan, B.; Navarro, C. y A. J. Lowe. 2010. Genetic consequences of multigenerational and landscape colonization bottlenecks for a neotropical forest pioneer tree, *Vochysia ferruginea*. *Tropical Plant Biology*. 3: 14-27.
- Doyle, J. y L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Earl, D. A. y B. M. von Holdt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.
- Evanno, G.; Regnaut, S. y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131(2): 479-491.
- Falush, D.; Stephens, M. y J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- Flores, G. J. G.; Moreno, G. D. A. y CH. A. Quiñones. 2003. Selección de Criterios para Evaluar el Manejo Forestal Sustentable. Jalisco, México. Publicación Especial No. 2. Centro de Investigación Regional del Pacífico Centro. INIFAP 46 pp.
- Frankham, R.; Ballou, J. D. y D. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, United Kingdom. 617 pp.
- Gadow, K.; Sánchez, O. S. y C. O. A. Aguirre. 2004. Manejo forestal con bases científicas. *Madera y Bosques* 10(2): 3-16.
- Galván-Hernández, D. M.; Lozada-García, J. A.; Flores-Estévez, N.; Galindo-González, J.; y S. M. Vázquez-Torres. 2015. Variation and genetic structure in *Platanus mexicana* (Platanaceae) along riparian altitudinal gradient. *International Journal of Molecular Sciences* 16:2066-2077.
- Gamerman, D. y H. F. Lopes. 2006. Markov chain Monte Carlo: Stochastic simulation for Bayesian inference. Chapman & Hall/CRC Press. Boca Raton, FL.
- Geraghty, P. T.; Williamson, J. E.; Macbeth, W. G.; Wintner, S. P.; Harry, A. V.; Oviden, J. R. y M. R. Gillings. 2013. Population expansion and genetic structure in *Carcharhinus brevipinna* in the southern Indo-Pacific. *PLoS ONE* 8(9): e75169. doi:10.1371/journal.pone.0075169
- Ghazoul, J., y R. U. Shaanker. 2004. Sex in space: Pollination among spatially isolated plants. *Biotropica* 36: 128-30.
- Gómez, J. D.; Monterroso, A. L. y J. A. Tinoco. 2007. Distribución del cedro rojo (*Cedrela odorata*) en el Estado de Hidalgo, bajo condiciones actuales y escenarios de cambio climático. *Maderas y Bosques* 13(2): 29-49.
- Grime, J. P. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *American Naturalist* 111: 1169-1194.

- Hammer, O.; Harper, D. A. T. y P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 4(1): 9.
- Hamrick, J. L.; Linhart Y. B. y J. B. Miton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.
- Hernández, G.; Buonamici, A.; Walker, K.; Vendramin, G. G.; Navarro, C. y S. Carvers. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. *Conservation Genetics* 9: 457-459.
- Hernández, L. G. 2008. Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscapes and primary forests. (Tesis de posgrado) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 74pp.
- Jakobsson, M. y N. A. Rosenberg. 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.
- Jump, A. S. y J. Peñuelas. 2006. Genetic effects of chronic habitat fragmentation in wind-pollinated tree. *Proceeding of National Academic of Science* 103:21 8096-8100.
- Kangalawe R. M. y J. Lyimo. 2010. Population dynamics, rural livelihoods and environmental degradation: Some experiences from Tanzania. *Environment and Sustainable Development* 12 (6): 985-997.
- Krishnadas, M.; Kumar, A. y L. S. Comita. 2016. Environmental gradients structure tropical tree assemblages at the regional scale. *Journal of Vegetation Science*. Doi:10.1111/jvs.12438
- Lawton, J. H.; Bignell, D. E.; Boulton, B.; Bloemers, G. F.; Eggleton, P.; Hammond, P. M.; Hodda, M.; Holt, R. D.; Larsen, T. B.; Mawdsley, N. A.; Stork, N. E.; Srivastava, D.S. y A. D. Watt. 1998. Biodiversity inventories, indicator taxa and effects of habitat modification in tropical forest'. *Nature* 391: 72-76.
- Lazar, I. y I. Lazar. 2010. Gel Analyzer: Freeware 1D gel electrophoresis image analysis software. Available online: <http://www.gelanalyzer.com>.
- Lengkeek, A. G.; Jaenicke, H. y I. K. Dawson. 2004. Genetic bottlenecks in agroforestry systems: results of tree nursery surveys in East Africa. *Agroforestry Systems* 63: 149-155, 2004.
- Mace, G. M.; Collar, N.; Gaston, K. J.; Hilton-Taylor, C.; Akakaya, H. R.; Leader-Williams, N.; Milner-Gulland, E. J. y S. N. Stuart. 2008. Quantification of extinction risk: IUCN's system for classifying threatened species. *Conservation Biology* 22: 1424-1442.
- Martorell, C. y E. M. Peters. 2005. The measurements of chronic disturbance and its effects on the threatened cactus *Mammillaria pectinifera*. *Biological Conservation* 124: 199-207.
- Miller, M. P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) v 1.3. A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University. Software distributed by the author.

- Muellner, A.; Pennington, T.; Koecke, A. y S. Renner. 2010. Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central and South America. *American Journal of Botany*, 97(3):511-518.
- Namkoong, G.; Boyle, T.; El-Kassaby, Y.; Eriksson, G.; Gregorius, H. R.; Joly, H.; Kremer, A.; Savolainen, O.; Wickneswari, R.; Young, A.; Zeh-Nlo, M. y R. Prabhu. 2002. Criteria and indicators for sustainability forest management: assessment and monitoring of genetic variation. Forest Genetic Resources Working Papers, Working Paper FGR/37E. Forest Resources Development Service, Forest Resource Division, FAO, Rome. 25 pp.
- Nishimura, M. y H. Setogushi. 2011. Homogeneous genetic structure and variation in tree architecture of *Larix kaempferi* along altitudinal gradients on Mt. Fuji. *Journal of Plant Research* 124: 253-263.
- NOM0-59-SEMARNAT. 2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Diario Oficial de la Federación. Jueves 30 de Diciembre 2010.
- Ortega, Z. E. M. 2013 Bosques de alto valor de conservación en el Estado de Hidalgo, México, Caso: Ejido la estancia, desde el aspecto social y ambiental. *European Scientific Journal* 9(32): 231-241.
- Oshawa, T.; Tsuda, Y.; Saito, Y. y Y. Ide. 2011. The genetic structure of *Quercus crispula* in northeastern Japan as revealed by nuclear simple sequence repeat loci. 2011 *Journal of Plant Research* 124: 645-654.
- Otero, A.; De la Cruz; M. y K. Onaya. 1997. El Uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:85-117.
- Parchman, T. L.; Benkman, C. W.; Jenkns, B. y C. A. Buerkle. 2011. Low levels of population genetics structure in *Pinus contora* (Pinaceae) Across a geographic mosaic of co-evolution. *American Journal of Botany* 98(04):669-679.
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539.
- Pennington, T. D. 1981. Flora Neotropica; monograph 28. *Meliaceae*. New York Botanic Garden. New York. 472 pp.
- Pickett, S. T. A. y P. S. White. 1985. The ecology of natural disturbance and patch dynamics. Academic press, London. 472pp.
- Pickett, S. T. A.; Kolasa, J.; Armesto, J. J. y S. L. Collins. 1989. The ecological concept of disturbance and its expression at various hierarchical levels. *Oikos* 54:129-136.
- Popradit, A.; Srisatit, T.; Kiratiprayoon, S.; Yoshimura, J.; Ishida A.; Shiyomi, M.; Murayama, T.; Chantaranonthai, P.; Outtarabakorn y I. Phomma. 2015. Anthropogenic effects on a tropical forest according to the distance from human settlements. *Nature Science Report* 5:14689 doi 10.1038/srep14689.
- Pritchard, J. K.; Stephens, M. y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959.
- RAN. 2012. Registro Agrario Nacional y el Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Atlas de propiedad social y servicios ambientales en México, México, D.F., 32pp.

- Reichhardt, K. L.; Mellink, E.; Nabhan, G. P. y A. Rea. 1994. Habitat heterogeneity and biodiversity associated with indigenous agriculture in the Sonoran Desert. *Etnoecologica* 2: 21–34.
- Rivera-Fernández, A. 2012. Diversidad genética y estructura poblacional de *Ceratozamia mexicana* Brongn. Tesis doctoral Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada de la Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México.
- Rosenberg, N. A. 2004 DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137-138.
- Rykiel, E. J. 1985. Towards a definition of ecological disturbance. *Australian Journal of Ecology* 10:361-365.
- Schaberg, P. G.; DeHayes, D. H.; Hawley, G. J. y S. E. Nijensohn. 2008. Antropogenic alterations of genetic diversity within tree populations: Implications for forest ecosystem resilience. *Forest Ecology and Management* 256: 855-862.
- SEMARNAT. 2002. Superficie Forestal por Ecosistema y Tipo de Vegetación (hectáreas) Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental, Dirección General de Federalización y Descentralización de Servicios Forestales y de Suelo. México.
- SEMARNAT-Comisión Nacional Forestal. 2005. Productos de Plantaciones Forestales y Plantaciones Forestales por Estado. Coordinación General de Producción y Productividad. México.
- SEMARNATH. 2011. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales de Hidalgo. Programa Estatal Forestal 2011-2016. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales de Hidalgo. pág. 48.
- SEMARNAT-UNAM. 2001. Inventario Nacional forestal de la República Mexicana. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales-Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Sosa, V. W. T. 2011. Determinación de la variabilidad genética de cinco poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L. en Nicaragua, usando marcadores RAPDs y morfológicos. (Tesis de pregrado) Universidad Autónoma de Nicaragua, Facultad de Ciencias y Tecnología, León, Nicaragua. 70 pp.
- Styles, B. T. y P. K. Khosla. 1976. Cytology and reproductive biology of Meliaceae. *En*: Burley, J. y B. T. Styles (eds). Págs. 61-68. *Tropical trees, variation, breeding and conservation*. Academic Press, Londres.
- Svensson, J. R. 2010. Ecological disturbances: The good, the bad and the ugly (Tesis Doctoral) Department of Marine Ecology-Tjärnö, University of Gothenburg, Sweden, 33 pp.
- Takezaki, N. y M. Nei. 1996. Genetic distance and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics* 144: 389-399.
- Toledo, V. M.; Ortiz, B. y S. Medellín-Morales. 1994. Biodiversity islands in a sea of pasturelands: Indigenous resource management in the humid tropics of Mexico. *Etnoecológica* 2: 37-50.
- UICN. 2016. *Cedrela odorata* L. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 12 February 2016.

- Vargas, H. J.; Bermejo, V. J. y F. Thomas-Ledig. 2004. Manejo de Recursos Genéticos Forestales, Segunda Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México, y Comisión Nacional Forestal, Zapopan, Jalisco, 207 pp.
- Vázquez-Yanes, C.; Batis-Muñoz, A. I.; Alcocer Silva, M. I.; Gual-Díaz, M. y C. Sánchez-Dirzo. 1999. Árboles y arbustos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación. Reporte técnico del proyecto J084. CONABIO-Instituto de Ecología, UNAM. México. 144-147pp.
- Williams-Linera G. y F. Lorea. Tree species diversity driven by environmental and anthropogenic factors in tropical dry forest fragments of central Veracruz, Mexico. 2009 *Biodiversity and Conservation* 18:3269.
- Yang, L.; Lui, Z.; Li, J. y R. J. Dyer. 2015. Genetic structure of *Pinus henryi* and *Pinus tabuliformis*: Natural landscapes as significant barriers to gene flow among populations. *Biochemical Systematics and Ecology* 61: 124-132.
- Young, A.; Boyle, T. y T. Brown. 1996. The population consequences of habitat fragmentation for plants. *TREE* 11(10): 413-418.

11 ANEXOS

11.1 Permiso de colecta


SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06725 /16
CIUDAD DE MÉXICO 08 DE JULIO DE 2016

DR. ARTURO SANCHEZ GONZALEZ
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERIA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
CALLE REINA DE LOS BONDADOSOS No. 1556
COLONIA PASEO DE LAS REINAS 5ª SECCIÓN
MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO
C.P. 42184 - MÉXICO
TEL: 01 (771) 710 6708, E-MAIL: artsag@hotmail.com

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 19 fracción XXV y 32 fracción VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la licencia de colecta científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto de investigación sobre plantas:

- Colecta de hasta diez (10) hojas y cinco (05) flores de hasta diez individuos de la especie "magnolia" **Magnolia rzedowskiana** por localidad de colecta.
- Colecta de hasta dos (02) hojas por ejemplar de hasta dos (02) individuos de la especie "helecho" **Marattia spp.** Por localidad de colecta.
- Colecta de hojas de la especie "helecho" **Dicksonia sellowiana**.
- Colecta de hasta (10) hojas por individuo, de hasta diez individuos por población de la especie "cedro rojo" **Cedrela odorata**.
- Colecta de hasta quince (15) folíolos por individuo de hasta quince (15) individuos por población y hasta tres (03) estróbilos por población de cicadas del género **Ceratozamia**.
- Colecta de diez (10) hojas por individuo de diez individuos por población de la especie "haya" **fagus grandifolia**.
- Colecta de hasta dos (02) muestras para herborizar por especie y por localidad de colecta de ejemplares que se encuentren en riesgo de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.

Las actividades se llevarán a cabo en los **estados de Guerrero, Hidalgo, San Luis Potosí, Querétaro, Veracruz, Puebla, Nuevo León y Tamaulipas**. La presente autorización tendrá **duración de un (01) año a partir de la emisión de la misma**.

Continúa al reverso.../
Hoja 1 de 2

Ejército Nacional número 223,
Colonia Anáhuac, Delegación Miguel Hidalgo
Código Postal: 11520, Distrito Federal

La presente se expide con el aval de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con la colaboración de la Biol. Marisol Gutiérrez Lozano, Dr. Pablo Octavio Aguilar, Biol. Manuel Alejandro Macedo Villareal, Estu. De Biol. Yesica Vera Barrios, **debiendo sujetarse obligatoriamente el titular y los colaboradores a las siguientes condiciones:**

1.- Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2.- En todo momento el investigador será responsable de los impactos significativos que haya sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si el riesgo es alto.

3.- Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegación Federal de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en los **Estados de Guerrero** 01 (744) 434 1000, **Hidalgo** 01 (771) 717 9416, **Nuevo León** 01 (81) 8369 8913, **Puebla** 01 (222) 229 9506, **Querétaro** 01 (442) 238 3410, **San Luis Potosí** 01 (444) 834 0635, **Tamaulipas** 01 (834) 318 5254, **Veracruz** 01 (228) 841 6521, enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

4.- La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, las muestras botánicas obtenidas serán llevadas y analizadas en el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, **y el titular de la autorización asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(los) depósitos(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado.**

5.- Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.

6.- De acuerdo a que la Dirección General de Vida Silvestre es la autoridad competente para evaluar y dictaminar solicitudes de colecta de fauna y flora en riesgo y de acuerdo con el Artículo 1º de la Ley General de Vida Silvestre y 123 Fracción IV del Reglamento de la Ley federal de Vida Silvestre, su solicitud prestada, se evaluó y dictaminó a lo establecido en la modalidad B: Por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo.

7.- Queda estrictamente **prohibido** efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8.- De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento del material biológico colectado para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06725 /16

CIUDAD DE MÉXICO 08 DE JULIO DE 2016

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de observar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Así mismo y tomando en consideración lo establecido en el Artículo 87 de la Ley General de Vida Silvestre el titular de la presente deberá contar con el consentimiento previo, expreso e informado de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

ATENTAMENTE
LA DIRECTORA GENERAL DE VIDA SILVESTRE



SEMARNAT
YOLANDA AURORA ALANIZ PASINI.

- C.c.p- C. Joel González Moreno.- Director General de Inspección de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros, PROFEPA. e-mail: vida_silvestre@profepa.gob.mx, imejia@profepa.gob.mx
C. Martín Vargas Prieto.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Guerrero.- e-mail: delegado@guerrero.semarnat.gob.mx
C. Guillermo Cueva Sada.- Delegada Federal de la SEMARNAT en el Estado de Nuevo León.- e-mail: delegado@nl.semarnat.gob.mx
C. Federico Vera Copca.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Hidalgo.- e-mail: delegado@hidalgo.semarnat.gob.mx
C. Daniela Migoya Mastretta.- Delegada Federal de la SEMARNAT en el Estado de Puebla.- e-mail: delegado@puebla.semarnat.gob.mx
C. Oscar Moreno Alanis.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado Querétaro.- e-mail: delegado@queretaro.semarnat.gob.mx
C. José Antonio Undiano Errejón.- Encargado del Despacho de la SEMARNAT en el Estado de San Luis Potosí.- e-mail: delegado@slp.semarnat.gob.mx
C. Jesús González Macías.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Tamaulipas.- e-mail: delegado@tamauipas.semarnat.gob.mx
C. José Antonio González Azuara.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Veracruz.- e-mail: delegado@veracruz.semarnat.gob.mx
Biol. Bernito Bermudez Almada.- Dirección Regional Península de Baja California y Pacífico Norte.- e-mail: bermudez@conanp.gob.mx
C. Miguel Ángel Espinosa Luna.- Coordinador de Asesores de la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental.- e-mail: coordinacion_sgpa@semarnat.gob.mx
C. Fernando Sánchez Camacho.- Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. e-mail: fsanchez@semarnat.gob.mx

Archivo General 09/K4-0033/07/16, 09/O1-0037/07/16

c:oscar/colecta cientifica/ArturoSanchezGonzalez(Plantas) SUNIVS (07-07-16)
Hoja 2 de 2

"Por una cultura ecológica y el uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este asunto son remitidas vía electrónica".

Ejército Nacional número 223
Colonia Anáhuac, Delegación Miguel Hidalgo
Código Postal 11320 Distrito Federal

11.2 Protocolo de extracción de DNA modificado de Doyle y Doyle (1987).

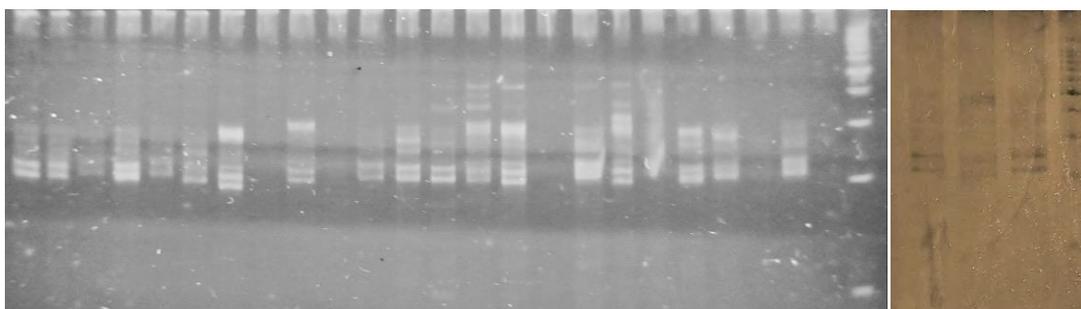
1. En un mortero estéril y con nitrógeno líquido macerar 0.5gr de tejido vegetal.
2. Agregar 1 ml del buffer de extracción (2% de **CTAB**, 1.42 M **NaCl**, 20 mM **EDTA**, 10 mM **tris-HCL**, 2 % **PVP** y 4 mM de ácido ascórbico) y se recuperar en un microtubo de 2 ml.
3. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600µl del buffer **CTAB** sin 2-β-mercaptoetanol y 20 µl de **RNA**sa (1 mg/ml) incubando a 65°C durante 90 min, después se agregará 20 µl de proteinasa K (1 mg/ml), incubando a 65°C durante 30 min.
4. Centrifugar las muestras por 10 min a 10,000 RPM, después agregar 600 µl de cloroformo:isoamilico (24:1) homogenizar con vortex y se centrifugó durante 10 min a 10,000 RPM.
5. Tomar el sobrenadante y se colocar en un nuevo tubo al cual se le agregará nuevamente 600 µl de cloroformo:isoamilico (24:1) homogenizar y se centrifugar durante 10 min a 10,000 RPM.
6. Tomar el sobrenadante y colocar en un nuevo tubo al cual se le agregará 2/3 del volumen final de isopropanol frío para precipitar el **DNA**, el cual se deja reposar 20 min a -20 °C.
7. Centrifugar durante 10 min a 12,000 RPM, decantar cuidadosamente el sobrenadante para evitar perder la pastilla de **DNA**, lavar con 250 µl etanol al 70 % y centrifugada durante 10 min a 14,000 RPM.
8. Eliminar el etanol cuidadosamente sin perder la pastilla de **DNA** y volver a repetir el lavado con etanol y la centrifugación. Una vez completamente seco el tubo agregar 100 µl de agua ultra pura estéril.

Limpeza de **DNA**

9. Agregar 300 µl de **dH₂O** y 400 µl de cloroformo:octanol (24:1) esto se homogenizar perfectamente y se centrifugar durante 10 min a 10,000 RPM.
10. Tomar el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar la interface, transferir un nuevo microtubo y agregar 400 µl de cloroformo:octanol (24:1) homogenizar perfectamente y se centrifugar durante 10 min a 10,000 RPM.
11. Tomar el sobrenadante teniendo cuidado de no tomar la interface y se transferir a un nuevo microtubo, agregar 65 µl de acetato de sodio (3 M pH 5.2) y 600 µl de isopropanol y se dejar reposar 20 minutos a -20°C.
12. Posteriormente se centrifugar a 14,000 RPM durante 15 min, decantar teniendo cuidado de no mover la pastilla formada y se adicionar 250 µl de etanol absoluto frío y se centrifugo a 10,000 RPM por 7 min, decantar nuevamente teniendo cuidado de no desechar la pastilla y agregar 250 µl de etanol 70% frío se centrifugo a 10,000 RPM por 5 min, decantar tratando de eliminar la mayor cantidad de etanol sin desechar la pastilla, una vez seca, agregar 60 µl de **dH₂O** ultrapura estéril y congelar a -20°C para su posterior análisis.

11.3 Geles de poliacrilamida

A la izquierda se observa un ejemplo de los geles de poliacrilamida que fueron ingresados al programa GelAnalyzer (el peso calculado de pares de bases de izquierda a derecha es el siguiente; 207 y 222, 204 y 219, 211 y 225, 203 y 219, 209 y 224, 198 y 2016, 190 y 202, vacío, 197 y 201, vacío, 202 y 221, 202 y 215, 199 y 213, 197 y 212, 195 y 209, vacío, 202 y 221, 197 y 210, vacío, 200 y 213, 203 y 215, vacío, 211 y 224, vacío, Ladder 1kb) y que posteriormente fueron corregidos de acuerdo con la propuesta de eliminación de alelos nulos o repetidos (Chybicki y Burczyk, 2009). A la derecha se muestra un gel de acrilamida desnaturalizado con el cual corroboro que los pesos moleculares obtenidos con las correcciones de Chybicky y Burczyk eran constantes y similares (215pb y 249pb respectivamente), por lo que se consideró que la técnica es viable para obtener resultados confiables.



11.4 Evaluación del equilibrio de Hardy-Weinberg por locus y por población Chi cuadrada (ChiSq), grados de libertad (DF), probabilidad (prob) y significancia (Signif), para el equilibrio de Hardy-Weinberg en los nueve loci para seis poblaciones de *Cedrela odorata* evaluados en el estado de Hidalgo.

Locus		Poblaciones					
		Coatenahuatl	San Pedro	Tamala	Chiconcoac	Coyolapa	Huextetilla
Ced2	ChiSq	32.588	25.523	144.171	33.549	71.785	94.41
	DF	10	21	78	15	36	55
	Prob	0	0.225	0	0.004	0	0.001
	Signif	***	ns	***	**	***	***
Ced18	ChiSq	58.074	63.131	52.32	38.888	51.117	115.361
	DF	36	36	36	36	45	78
	Prob	0.011	0.003	0.039	0.341	0.246	0.004
	Signif	*	**	*	ns	ns	**
Ced41	ChiSq	67.259	49.74	113.5	47.42	80.494	92.781
	DF	45	45	66	45	45	45
	Prob	0.017	0.29	0	0.374	0.001	0
	Signif	*	ns	***	ns	***	***
Ced44	ChiSq	42.37	35.849	48.822	31.918	82.081	130.598
	DF	36	21	28	15	45	78
	Prob	0.215	0.023	0.009	0.007	0.001	0
	Signif	ns	*	**	**	***	***
Ced54	ChiSq	37	49.028	31.01	18.671	29.19	111.749
	DF	36	28	21	21	45	28
	Prob	0.423	0.008	0.073	0.606	0.967	0
	Signif	ns	**	ns	ns	ns	***
Ced61a	ChiSq	17.123	40.858	16.851	32.389	53.599	69.993
	DF	15	28	15	28	28	45
	Prob	0.312	0.055	0.328	0.259	0.002	0.01
	Signif	ns	ns	ns	ns	**	**
Ced65	ChiSq	27.498	30.281	13.868	13.513	32.95	33.603
	DF	28	28	15	21	28	21
	Prob	0.491	0.35	0.536	0.89	0.238	0.04
	Signif	ns	ns	ns	ns	ns	*
Ced95	ChiSq	33.508	36.055	37.013	33.658	112.532	60.748
	DF	28	28	28	21	55	45
	Prob	0.218	0.141	0.119	0.039	0	0.059
	Signif	ns	ns	ns	*	***	ns
Ced131	ChiSq	18.041	27.764	66.298	30.156	41.745	41.905
	DF	28	15	21	21	28	15
	Prob	0.925	0.023	0	0.089	0.046	0
	Signif	ns	*	***	ns	*	***
Poblacional	ChiSq	103.9634049	118.3650946	216.6298416	77.03285847	230.7898169	292.4627158
	DF	104	97.5	129	82	157	186
	Prob	0.482568029	0.069311383	2.16E-06	0.634439282	0.000114905	1.18E-12
	Signif	ns	ns	***	ns	***	***

