

Distribución geográfica de la diversidad genética molecular de dos especies de *Cedrela* (*C. lilloi* y *C. balansae*) sujetas a severos procesos de degradación en la Selva Tucumano-Boliviana

Noga Zelener^{1,6}, María C. Soldati^{1,6}, María V. Inza^{1,6}, Raúl R. Aguirre V.²,
Daniel Salek², Alejandro Araujo³, Maarten van Zonneveld^{4,6}, Luis Fornes^{5,6}

¹ Instituto de Recursos Biológicos, CIRN, CNIA, INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina

² CIAT, Santa Cruz, Bolivia

³ Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, Santa Cruz, Bolivia

⁴ Bioersity International, Regional Office for the Americas, Cali, Colombia

⁵ EEA Famaillá, INTA, Tucumán, Argentina

⁶ Miembros de LAFORGEN

RESUMEN

Cedrela lilloi y *C. balansae*, especies altamente valoradas por sus atributos maderables, se advierten amenazadas por un intenso aprovechamiento forestal y el cambio en el uso de la tierra. A fin de cuantificar la diversidad genética remanente en sus poblaciones, fueron estudiadas mediante marcadores moleculares diecinueve poblaciones de *C. lilloi* y ocho de *C. balansae*, con distribución natural en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano-Boliviana. En *C. lilloi*, el análisis de 371 loci polimórficos (fAFLPs) denotó una variación en los niveles de diversidad intrapoblacional ($H_e = 0.077$ a 0.143) que tiene correspondencia inversa con la variación latitudinal, indicando un claro patrón de incremento de la diversidad a medida que disminuye la latitud ($R^2 = 0.75$; $p < 0.0001$). La diferenciación genética entre poblaciones (AMOVA) fue moderada ($\Phi_{pt} = 0.15$; $p \leq 0.001$), no obstante, la asignación de individuos a los grupos genéticos detectados ($K = 6$), reflejó una distribución divergente entre las poblaciones bolivianas y las argentinas, resultados que también se traducen en el agrupamiento de las poblaciones sobre medidas de distancia genética poblacional. En *C. balansae*, la selección de siete pares de *primers* de SSRs, transferidos de especies del mismo género, permitió estimar una diversidad genética promedio moderada ($H_e = 0.643$), así como una baja divergencia genética (AMOVA) entre poblaciones ($F_{st} = 0.049$), relacionada a un flujo genético considerable ($Nm = 3.71$), observándose además, la ausencia del agrupamiento de poblaciones por localización geográfica. Los niveles de diversidad en la especie están principalmente asociados a una reducida área de dispersión natural. Para ambas especies, los actuales niveles de diversidad genética están adicionalmente vinculados a la accesibilidad e historia de uso de las poblaciones y al disturbio de los sectores aprovechados en las Áreas Protegidas, con anterioridad a su creación. La conservación de la diversidad genética requiere, en principio, del conocimiento de la magnitud y distribución de dicha diversidad así como de los factores que la modulan. En este sentido, los estudios desarrollados en el presente trabajo, sobre la base de herramientas moleculares, apoyan acciones dirigidas a la preservación de dos especies de importancia socioeconómica, en las Selvas subtropicales de montaña de Argentina y de Bolivia.

Palabras clave: *Cedrela lilloi*, *Cedrela balansae*, Selva Tucumano-Boliviana, AFLP, SSR, diversidad genética, conservación

INTRODUCCIÓN

La Selva Tucumano-Boliviana representa la expresión más meridional de un sistema que acompaña a las cadenas montañosas de los Andes hasta el Noroeste argentino (NOA). Se extiende desde el denominado "Codo andino" a los 18° LS, por los departamentos de Santa Cruz, Chuquisaca y Tarija en Bolivia, hasta los 29° LS en Argentina, atravesando las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán (Cabrera 1994; Navarro & Ferreira 2004), sobre un amplio gradiente altitudinal (400-3000 msnm) caracterizado por estratos de vegetación con composición específica bien diferenciable (Brown *et al.*, 2001).

Este ecosistema es de inestimable valor por su elevado nivel de diversidad biológica y alta presencia de recursos genéticos y endemismos. No obstante, ha estado sujeto a severos procesos de degradación de sus formaciones naturales en respuesta a una intensa actividad forestal, desarrollada tradicionalmente bajo un sistema con patrón claramente extractivo y selectivo, condición que se ve agudizada por la creciente conversión de hábitats naturales para el desarrollo agrícola, campos de pastoreo y la explotación hidrocarburífera (Brown *et al.*, 2006; SAYDS 2007; Grau & Aide 2008). El NOA advierte tasas anuales de deforestación del orden de -0.32%, y la transformación del 70-80% de la superficie boscosa de la Selva Pedemontana para actividades agropecuarias, debido a su mayor accesibilidad, altas tasas relativas de

crecimiento vegetal y mayor estacionalidad climática, constituyendo el estrato boscoso que presenta mayor presión antrópica (Brown & Malizia 2004; Minetti 2006; UMSEF-SAYDS 2007). Asimismo, la deforestación anual en Bolivia sufrió un incremento de 275.128 has. hasta alcanzar 319.692 has., según reportes de la ex Superintendencia Forestal Proyecto CDI, para el periodo 2004-2008, registrándose un notable aumento en la conversión de bosques a otros usos, siendo el departamento de Santa Cruz una de las regiones que reviste los mayores niveles de disturbio (Programa ONU-REDD Bolivia, 2010).

En este contexto, las especies nativas que presentan mayor valor en el mercado de productos forestales, tales como el cedro coya (*Cedrela lilloi*) y el cedro orán (*Cedrela balansae*), evidencian en las últimas décadas un decrecimiento sistemático de sus existencias maderables y de la calidad en la oferta del insumo para el sector forestal, ostentando condiciones actuales de alto riesgo (IUCN 2010), debido a procesos de fragmentación de sus masas boscosas, el decrecimiento en los niveles de variabilidad genética y cambios significativos en la estructura genética poblacional, entre otros efectos, comprometiendo su conservación y domesticación.

Frente a este escenario, se origina en el ámbito regional de la gestión forestal sostenible, la necesidad de orientar esfuerzos a generar nuevos conocimientos sobre el acervo genético de estas especies, de importancia socioeconómica. Para tales fines, el empleo de marcadores moleculares constituye una herramienta útil, que permite conocer la amplitud y distribución de la variabilidad genética actualmente disponible, complementando la información requerida para una ordenación que propicie simultáneamente objetivos de protección y producción. Entre las metodologías ampliamente utilizadas, para diversos aspectos conexos a la actividad forestal, se encuentran los fAFLPs (fluorescence Amplified Fragment Length Polimorfisms, Vos *et al.*, 1995) y los SSRs (Simple Sequence Repeats, Tautz 1989), técnicas moleculares que en especies del género *Cedrela* han sido empleados para inferir niveles de variación genética (intra e interpoblacional), brindar información sobre el sistema reproductivo, identificar procesos de endogamia, estimar niveles de flujo génico y evaluar el impacto de la fragmentación sobre la diversidad genética (Kageyama *et al.*, 2003, 2004; Cavers *et al.*, 2003; Navarro *et al.*, 2005; De la Torre *et al.*, 2008; Hernández Sánchez 2008).

En las especies objeto de estudio, la implementación de marcadores AFLPs ha permitido analizar la incidencia de la variación geográfica y el efecto del aprovechamiento forestal sobre la diversidad y estructura genética de poblaciones naturales de *C. lilloi*, en Argentina (Inza *et al.*, 2008, 2009, Inza 2010). Asimismo, la aplicación de SSRs y fAFLPs en poblaciones de *C. balansae*, permitió incrementar el conocimiento de los patrones de distribución de la variabilidad genética, en su área de dispersión natural, en el país (Soldati 2010; Soldati *et al.*, 2010).

En el presente trabajo se profundizan los estudios iniciados por el INTA (Argentina) en *C. lilloi* y *C. balansae*, extendiendo el análisis genómico a nuevas poblaciones naturales, distribuidas en los bosques montanos y pedemontanos de Argentina y Bolivia, con la finalidad de aportar conocimientos que asistan a estrategias adecuadas de conservación en dichos recursos forestales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio

En *C. lilloi* (actualmente denominada *C. angustifolia*, Pennington & Muellner 2010) la actividad de exploración se realizó en los extremos Noroeste y Sureste de los Yungas Bolivianos (Navarro & Ferreira 2004) y en la Selva Tucumano-Boliviana a partir de su inicio en el "Codo andino", sitio donde ocurre un cambio en la orientación de la cordillera, que pasa a ser Norte-Sur franco, y se encuentra el límite entre las dos provincias biogeográficas (Navarro & Maldonado 2002). Los sitios de muestreo en la Selva Tucumano-Boliviana se realizaron desde los 18° hasta los 27° LS, acompañando la fisonomía del ecosistema, sobre una topografía de serranías paralelas de orientación Norte-Sur y distribución naturalmente discontinua (Kessler & Beck 2001; Brown *et al.*, 2001), en una extensión aproximada de 1100 km. El muestreo comprendió los departamentos de Santa Cruz, Chuquisaca y Tarija, en Bolivia, y las provincias de Salta, Jujuy y Tucumán, en Argentina, abarcando la casi totalidad del rango de dispersión de la especie en este país, a través de los Sectores Latitudinales Norte (SLN), Centro (SLC) y Sur (SLS) definidos por Brown *et al.*, (2001). Fueron muestreadas 19 poblaciones naturales, distribuidas en Áreas Protegidas y No Protegidas, sobre el estrato altitudinal superior de la Selva Montana (700-1500 msnm) y en el Bosque Montano (1500-3000 msnm), donde la especie registra las mayores densidades (Malizia *et al.*, 2006; Toledo *et al.*, 2008) (Tabla 1). En *C. balansae* fueron muestreadas 9 poblaciones (Tabla 2), desde el límite con Bolivia (22° LS) hasta la frontera Sur-Este de dispersión natural de la especie (24° LS), en la provincia de Salta

(Argentina). Los sitios de muestreo comprendieron las provincias de Salta y Jujuy (SLN y SLC), en el estrato altitudinal más bajo del ecosistema, correspondiente a la Selva Pedemontana (400-700 msnm) donde habita la especie. Debido al importante nivel de intervención antrópica que registra dicho estrato boscoso y a que la localización de la mayor parte de las poblaciones no se registra dentro de Áreas Protegidas, solo han sido muestreadas poblaciones disturbadas.

Estrategia de muestreo

Las especies del género *Cedrela*, junto a otros géneros de la familia Meliaceae distribuidos en el Neotrópico, han sido clasificadas en el grupo de especies raras o especies que poseen baja densidad de individuos por hectárea (revisión Patiño Varela 1997), presentando además un patrón espacial agregado propio de especies claro-dependientes en el modo de regeneración (Grau 2000; Mostadedo & Fredericksen 2000; Grau *et al.*, 2003; Toledo *et al.*, 2008). En consecuencia, el muestreo tomó en consideración la densidad de individuos observada en cada rodal, procurando adicionalmente una distancia mínima de muestreo al azar de 100 m. entre individuos, a los efectos de reducir el muestreo de individuos emparentados (Gillies *et al.*, 1999). La colecta de material vegetal se realizó en el periodo de brotación, a fin de obtener hojas jóvenes, las que posteriormente fueron deshidratadas con sílica gel y conservadas a -20 °C, hasta su procesamiento.

La georreferenciación de las poblaciones se realizó mediante el sistema SIG (Sistema de Información Geográfica) y el empleo de GPS (Global Positioning System) para la determinación de la altitud y las coordenadas geográficas a las que fueron muestreados los individuos (Tablas 1 y 2), datos que se emplearon para la elaboración del mapa de localización geográfica de las poblaciones, mediante el programa ArcView GIS 3.2 (Figura 1).

Tabla 1: Localización geográfica de poblaciones naturales de *C. lilloi* muestreadas en Bolivia y Argentina. Se indica para cada población: Nombre, Código de Identificación (CI), Tamaño poblacional (N), País, Departamento/Provincia/Sector Latitudinal (Depto./Prov./Sector), Coordenadas geográficas y Altitud.

Población	CI	N	País	Depto./Prov./Sector	Lat. S – Long. O (°, min., seg.)	Altitud (msnm)
PN Madidi	BoPNM	14	Bolivia	La Paz; Iturralde y F. Tamayo	14 11 39.5 - 67 56 05.3	516
PN Amboró-Comarapa	BoPNC	13	Bolivia	Santa Cruz; M. M. Caballero	17 52 01.7 - 64 31 45.0	2267
Samaipata	BoSa	15	Bolivia	Santa Cruz; Florida	18 05 56.5 - 63 48 14.9	1887
Vallegrande	BoVg	6	Bolivia	Santa Cruz; Vallegrande	18 33 17.3 - 64 06 22.8	2201
Villa Serrano	BoVS	12	Bolivia	Chuquisaca; Belisario Boeto	19 00 59.2 - 64 19 51.3	2477
Muyupampa	BoMp	14	Bolivia	Chuquisaca; Luis Calvo	19 51 04.5 - 63 43 44.7	1382
Entre Ríos	BoER	12	Bolivia	Tarija; O'Connor	21 27 43.5 - 64 12 47.5	1811
RN El Nogalar	RNNg	16	Argentina	Sta. Victoria; Salta (SLN)	22 16 32.8 - 64 43 06.6	1825
Argencampo	ARD	9	Argentina	Sta. Victoria; Salta (SLN)	22 20 26.7 - 64 43 13.1	1728
PN Baritú	PNB	15	Argentina	Sta. Victoria; Salta (SLN)	22 29 56.9 - 64 44 53.8	1704
Empresa 3R	3RD	9	Argentina	Sta. Victoria; Salta (SLN)	22 32 15.8 - 64 45 12.4	1713
San Andrés	LSA	15	Argentina	Orán; Salta (SLN)	23 04 54.5 - 64 50 50.6	1744
PN Calilegua	PNCL	8	Argentina	Ledesma; Jujuy (SLC)	23 40 59.8 - 64 53 46.1	1642
La Ramada	LLR	12	Argentina	Ledesma; Jujuy (SLC)	23 57 54.1 - 65 09 32.9	1656
El Arenal	AL	8	Argentina	Sta. Bárbara; Jujuy (SLC)	24 20 26.2 - 64 20 31.1	1111
Metán	MT	10	Argentina	Metán; Salta (SLS)	25 23 24.4 - 65 00 37.6	1102
Choromoro	LCh	10	Argentina	Trancas; Tucumán (SLS)	26 22 09.2 - 65 28 06.5	1457
Sunchal	LSu	9	Argentina	Burruyacu; Tucumán (SLS)	26 30 55.5 - 65 06 07.2	1468
El Siambón	LS	15	Argentina	Tafí Viejo; Tucumán (SLS)	26 41 51.3 - 65 27 19.0	1389
PP La Florida	PPFL	12	Argentina	Monteros; Tucumán (SLS)	27 07 19.6 - 65 47 09.9	1328
Los Pizarros	LPi	10	Argentina	La Cocha; Tucumán (SLS)	27 45 20.6 - 65 41 42.3	1113

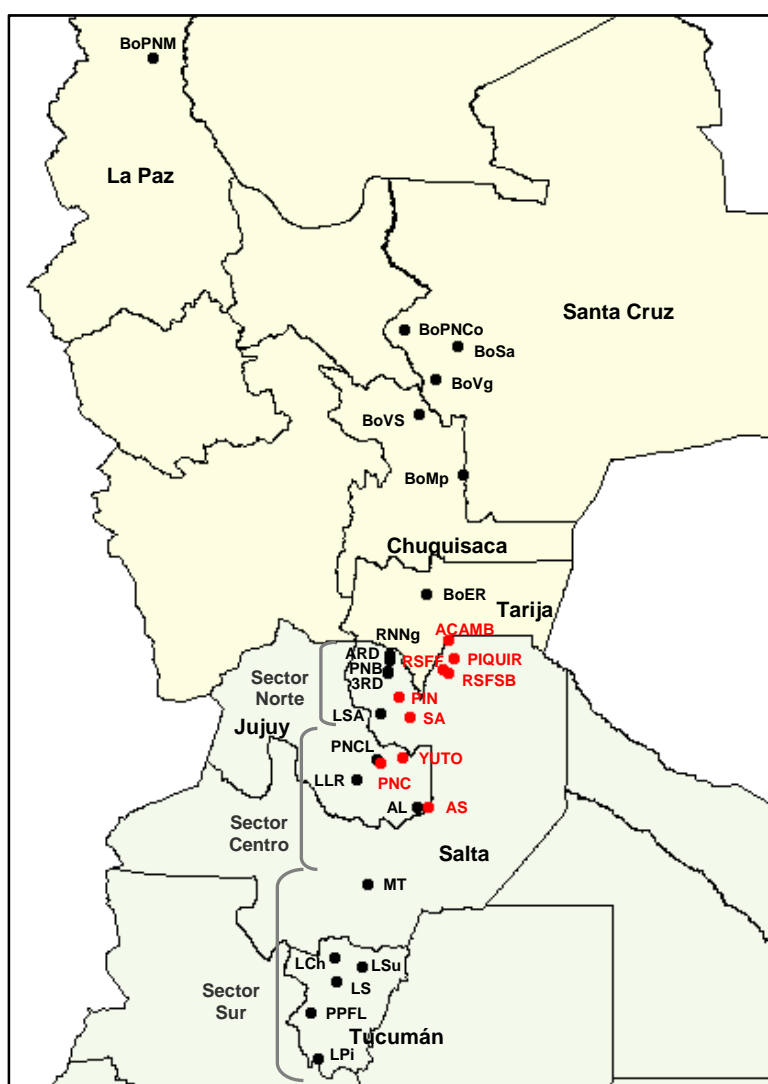
PN: Parque Nacional, RN: Reserva Nacional, PP: Parque Provincial; Sectores Latitudinales de la Selva Tucumano Boliviana (NOA): Sector Latitudinal Norte (SLN), Sector Latitudinal Centro (SLC), Sector Latitudinal Sur (SLS)

Tabla 2: Localización geográfica de poblaciones naturales de *C. balansae* muestreadas en Argentina. Se indica para cada población: Nombre, Código de Identificación (CI), Tamaño poblacional (N), Departamento/Provincia (Depto./Prov.), Coordenadas geográficas y Altitud

Población	CI	N	Depto./Prov.	Latitud S – Longitud O (°, min., seg.)	Altitud (msnm)
Acambuco	ACAMB	16	J.San Martín; Salta (SLN)	22 05 02.5 - 63 56 08.6	911
Piquirenda	PIQUIR	15	J.San Martín; Salta (SLN)	22 19 13.4 - 63 50 52.6	852
Río Seco (Flia. Falcón)	RSFF	10	J.San Martín; Salta (SLN)	22 27 57.5 - 63 59 49.5	665
Río Seco (Ftal. SB)	RSFSB	17	J.San Martín; Salta (SLN)	22 31 20.0 - 63 55 57.5	699
Pintascayo	PIN	12	Iruya; Salta (SLN)	22 51 15.2 - 64 36 36.7	926
San Andrés	SA	12	Orán; Salta (SLN)	23 06 47.4 - 64 27 35.7	471
Yuto	YUTO	16	Ledesma; Jujuy (SLC)	23 40 15.4 - 64 33 29.4	416
PN Calilegua	PNC	12	Ledesma; Jujuy (SLC)	23 44 59.7 - 64 51 08.7	707
Apolinario Saravia	AS	9	Anta; Salta (SLC)	24 20 15.8 - 64 12 04.9	589

PN: Parque Nacional; Sectores Latitudinales de la Selva Tucumano-Boliviana (NOA): Sector Latitudinal Norte (SLN), Sector Latitudinal Centro (SLC), Sector Latitudinal Sur (SLS)

Figura 1: Mapa de localización de los sitios de muestreo de *C. lilloi* (●) y *C. balansae* (●), en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano-Boliviana



Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN genómico, para ambas especies, se realizó sobre hojas secas y molidas mediante un equipo *TissueLyser* (QUIAGEN), siguiendo el protocolo general de Doyle & Doyle (1990), con modificaciones propias para las especies estudiadas. La concentración e integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8 %), con bromuro de etidio (0.002 % v/v) y su comparación con patrones de ADN comercial de concentración conocida (DNA fago *Lambda* 5µg/ml).

Delimitación específica de poblaciones

La conservación y mejora de las especies, presentan como requisito previo e indispensable, la correcta asignación específica de sus poblaciones. La delimitación morfológica de las especies de cedro en las zonas de transición, donde estas cohabitan, es compleja debido a la ausencia de caracteres morfológicos únicos que permitan distinguirlas inequívocamente. En este sentido, y a los fines de confirmar la identidad genética de algunas poblaciones (Pintascayo, Muyupampa y PN Madidi), se llevó a cabo un estudio de secuencias de ITS (Internal Transcribed Spacer), conforme el protocolo de Muellner *et al.*, (2009), las cuales fueron contrastadas con secuencias de referencia en el género (Muellner *et al.*, 2009; Pennington & Muellner 2010), depositadas en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Generación y selección de marcadores, genotipificación de individuos

Marcadores fAFLPs en C. lilloi

La metodología aplicada siguió el protocolo general de Vos *et al.*, (1995), empleando los *primers Eco+2/Mse+4* sugeridos por Cavers *et al.*, (2003) para *C. odorata*. Sobre la base de trabajos desarrollados para la especie en Argentina (Inza *et al.*, 2009), bajo técnicas tradicionales de separación (electroforesis vertical en geles de poliacrilamida) y detección de marcadores (tinción con AgNO₃), fueron seleccionadas dos combinaciones de *primers* (*Eco+AT/Mse+ACCA* y *Eco+AC/Mse+AACA*), en relación a la definición de patrones genéticos de alta resolución y la detección de un mayor número de *loci* polimórficos por combinación de *primers*. Los *primers Eco* fueron marcados con posterioridad mediante fluoróforos, a los fines de realizar la genotipificación de la totalidad de individuos, bajo sistemas basados en electroforesis capilar y la detección fluorescente de fragmentos amplificados (fAFLPs), en secuenciador automático (ABI 3130XL, Applied Biosystems). El análisis de los electroferogramas derivados se realizó mediante el programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

Marcadores SSRs en C. balansae

Hasta el momento no ha sido descrito el desarrollo de *primers* para la amplificación de SSRs en la especie, por lo que fue examinada la capacidad de transferencia y adaptación de *primers* heterólogos, desarrollados en especies pertenecientes al mismo género. Fueron optimizadas las condiciones de amplificación para 23 *primers* desarrollados en *C. odorata* (Hernández Sánchez 2008; Hernández Sánchez *et al.*, 2008; Hernández Sánchez 2009 com. pers.) y 3 *primers* desarrollados en *C. fissilis* (Gandara 2009), sobre una muestra de individuos provenientes de distintas poblaciones (Soldati 2010). Se emplearon sistemas tradicionales de separación y detección de marcadores a los efectos de una selección preliminar de *primers*, los que con posterioridad fueron marcados mediante fluoróforos, para la detección de fragmentos en secuenciador automático (ABI 3130XL). El análisis de electroferogramas se realizó mediante el programa GeneMapper 4.0

Análisis de datos

En *C. lilloi*, el análisis de los perfiles de fAFLPs consideró la presencia o ausencia del fragmento amplificado, para la construcción de matrices binarias de datos, evaluando solo el conjunto de *loci* polimórficos detectados. Los análisis se desarrollaron bajo el supuesto de poblaciones en Equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), aplicable a especies de libre cruzamiento como las forestales (Hamrick *et al.*, 1992; Vekemans *et al.*, 2002) y mediante sistemas de análisis *multilocus*, con un alto número de *loci* (Kremer *et al.*, 2005). La diversidad genética (Nei 1973) fue estimada a través de la Heterocigosidad esperada insesgada (*He*), el Porcentaje de *Loci* Polimórficos (PLP) y el N° de *Loci* Exclusivos (LE) por población, empleando el programa GenAlex 6.3 (Peakall & Smouse 2006). La diferenciación genética fue examinada a través de un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA), considerando diferentes niveles jerárquicos de estructura genética (GenAlex 6.3). Fueron estimados también, el número y distribución de grupos genéticos o *clusters* (K), con el programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2007) a través del Servicio de Biología Computacional de la Universidad de Cornell (Structure@BioHPC, URL:<http://cbsuapps.tc.cornell.edu/structure.aspx>), bajo las opciones *Admixture model*, *Allele Frequencies Correlated*, 50.000 (*burn-in*) y 500.000 iteraciones, en 10 repeticiones por K. Asimismo, fue aplicado como parámetro de segundo orden el valor modal de ΔK (Evanno *et al.*, 2005). Las distancias genéticas entre poblaciones fueron estimadas con

el programa AFLP-SURV 1.0 (Vekemans *et al.*, 2002), resultados luego empleados para un Análisis de agrupamiento (UPGMA), mediante el programa NTSYSpc vs 2.11W (Rohlf 1998).

Para el análisis de marcadores SSRs, en *C. balansae*, los alelos identificados en la totalidad de poblaciones fueron computados según el tamaño de los fragmentos amplificados con valores expresados en pares de bases, a los fines de elaborar las matrices de datos. La identificación de solo un alelo, para un *locus* dado en un individuo determinado, fue considerado como indicador del estado homocigota de dicho individuo en el *locus* analizado. La selección final de marcadores fue sustentada en la validación de datos respecto a posibles desvíos del EHW, generados por la presencia de alelos nulos, desequilibrio de ligamiento o endogamia, empleando los programas GenePop 4.0 (Rousset 2008) y GDA 1.1 (Lewis & Zaykin 2002). El conjunto de SSRs selecto fue utilizado para la estimación de parámetros descriptivos de la diversidad genética intrapoblacional (Multiplicidad alélica, número de alelos exclusivos, Heterocigosidad observada y esperada insesgada) y el análisis de diferenciación genética (AMOVA), considerando dos componentes de la varianza (Entre y Dentro de poblaciones) mediante el programa GenAlEx 6.3. Asimismo, fue estimado el flujo genético histórico (Nm) a partir del coeficiente F_{st} (Wright 1951) y su corrección por el número total de poblaciones examinadas ($Nm = (1 - F_{st})/4 \alpha F_{st}$) (Crow & Aoki 1984). Finalmente, fueron calculados los estadísticos F_{st} entre pares de poblaciones, con el objeto de realizar el correspondiente análisis de agrupamiento (UPGMA), utilizando el programa GDA 1.1.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Delimitación específica de poblaciones

El análisis de identificación genética permitió la reasignación específica de gran parte de los individuos de la población Pintascayo desde *C. balansae* a *C. saltensis* (Zapater *et al.*, 2004; Zelener *et al.*, 2010), excluyéndose este sitio de muestreo de los subsiguientes análisis. Estos resultados confirmaron estudios preliminares de diferenciación genética molecular, realizados en la totalidad de poblaciones caracterizadas fenotípicamente como *C. balansae* (Tabla 2). Los mismos revelaron una muy alta diferenciación genética (28%) de la población Pintascayo, respecto de las restantes poblaciones consideradas en su conjunto, resultados que también se reflejaron en los análisis de distancia genética individual y poblacional (Soldati 2010). Asimismo, los individuos procedentes de Muyupampa, en su mayor parte, y la población muestreada en el PN Madidi (La Paz, Norte de los Yungas Bolivianos), no se ajustaron a los patrones moleculares específicos de *C. lilloi*, siendo excluidas ambas poblaciones de los análisis de diversidad genética. Es de señalar que la especie ha sido referenciada para el departamento de La Paz (registros referenciados por el Missouri Botanical Garden), sin embargo, no fue hallada en esa zona de muestreo.

Cedrela lilloi

Diversidad genética

El análisis genómico de 19 poblaciones (216 individuos) sobre la base de 2 combinaciones de *primers* de AFLPs, permitió la detección de 371 *loci* polimórficos, número de marcadores ampliamente mayor al sugerido para análisis de diversidad y diferenciación genética, así como para la estimación de la distribución de grupos genéticos entre individuos (Hollingsworth & Ennos 2004; Cavers *et al.*, 2005; Bonin *et al.*, 2007).

La diversidad genética promedio, sobre el total de poblaciones analizadas, fue relativamente baja ($H_e = 0.107$), presentando un valor mínimo ($H_e = 0.077$) en Sunchal (SLS de la Selva Tucumano-Boliviana en Argentina) y un valor máximo ($H_e = 0.143$) en Comarapa (Yungas Bolivianos), en correspondencia inversa con la variación latitudinal, directriz que también se manifiesta en el porcentaje de *loci* polimórficos y el número de *loci* exclusivos, por población (Tabla 3). Asimismo, el nivel de diversidad genética promedio de las poblaciones localizadas en Bolivia ($H_e = 0.133$) fue mayor al valor promedio obtenido para las poblaciones localizadas en Argentina, en su conjunto ($H_e = 0.097$), tendencia que se mantiene aún cuando se lo compara con las poblaciones más diversas de Argentina, localizadas principalmente en el Sector Latitudinal Norte del ecosistema (NOA). El patrón de incremento de la diversidad genética a medida que disminuye la latitud, se reflejó también en el análisis de regresión lineal de la diversidad genética en función de la latitud, obteniéndose un coeficiente $R^2 = 0.75$, altamente significativo ($p < 0.0001$) (Figura 2).

La incidencia de la variación latitudinal en la diversidad genética de la especie fue descrita por Inza *et al.*, (2009) e Inza (2010), en estudios precedentes sobre las poblaciones distribuidas en Argentina. Brown *et al.*, (2001), señalan para la Selva de montaña del NOA, una marcada variación tanto altitudinal como latitudinal en cuanto a la riqueza específica, la que es

mayor en la Alta Cuenca del Río Bermejo (ACRB), en el extremo Noroeste de Argentina. Asimismo, Juárez *et al.*, (2007) describen un gradiente de disminución de la biodiversidad taxonómica en relación al aumento de la latitud, para esta ecorregión, patrón que De la Sota (1972) atribuye principalmente a un “empobrecimiento climático latitudinal”.

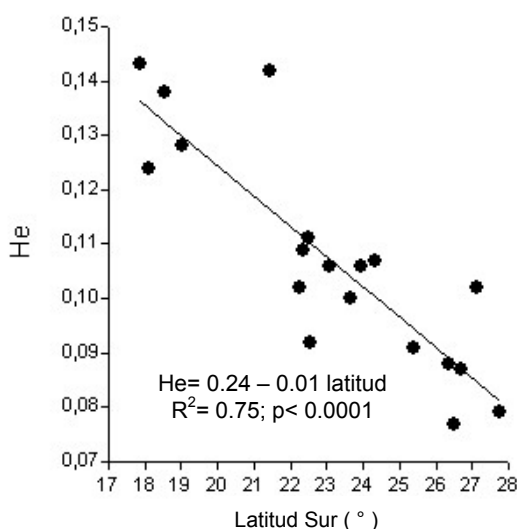
En particular, *C. lilloi* encuentra su extremo austral de dispersión natural en el extremo Sur de la Selva Tucumano-Boliviana, en Argentina, manifestando los menores niveles de diversidad en Tucumán (a excepción del PP La Florida), en consistencia con lo indicado por Gentry (2001), sobre un marcado decaimiento de los valores de diversidad biológica hacia los extremos subtropicales de Méjico y Argentina.

Tabla 3: Diversidad genética de 19 poblaciones naturales de *C. lilloi*, distribuidas en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano Boliviana. Se indican para cada población: Nombre y Código de identificación (CI), tamaño poblacional (N), Latitud, Heterocigosidad esperada insesgada (*He*), Porcentaje de *Loci* Polimórficos (PLP) y Número de *Loci* exclusivos (LE)

Población	CI	N	Latitud Sur (°, min, seg)	<i>He</i>	PLP (%)	LE
PN Amboró-Comarapa	BoPNC	13	17 52 01.7	0.143	49.06	11
Samaipata	BoSa	15	18 05 56.5	0.124	48.25	15
Vallegrande	BoVg	6	18 33 17.3	0.138	38.81	2
Villa Serrano	BoVS	12	19 00 59.2	0.128	43.94	7
Entre Ríos	BoER	12	21 27 43.5	0.142	44.47	5
RN El Nogalar (SLN)	RNNg	16	22 16 32,8	0.102	36.93	0
Argencampo (SLN)	ARD	9	22 20 26.7	0.109	37.47	0
PN Baritú (SLN)	PNB	15	22 29 56.9	0.111	47.17	7
Empresa 3R (SLN)	3RD	9	22 32 15.8	0.092	28.03	0
San Andrés (SLN)	LSA	15	23 04 54.5	0.106	35.58	3
PN Calilegua (SLC)	PNCL	8	23 40 59.8	0.100	30.73	2
La Ramada (SLC)	LLR	12	23 57 54.1	0.106	40.70	2
El Arenal (SLC)	AL	8	24 20 26.2	0.107	31.81	2
Metán (SLS)	MT	10	25 23 24.4	0.091	30.73	1
Choromoro (SLS)	LCh	10	26 22 09.2	0.088	23.99	0
Sunchal (SLS)	LSu	9	26 30 55.5	0.077	23.45	0
El Siambón (SLS)	LS	15	26 41 51.3	0.087	33.96	3
PP La Florida (SLS)	PPFL	12	27 07 19.6	0.102	33.42	1
Los Pizarros (SLS)	LPi	10	27 45 20.6	0.079	25.07	0

PN: Parque Nacional, RN: Reserva Nacional, PP: Parque Provincial; Sectores Latitudinales de la Selva Tucumano-Boliviana (NOA): Sector Latitudinal Norte (SLN), Sector Latitudinal Centro (SLC), Sector Latitudinal Sur (SLS)

Figura 2: Relación de la diversidad genética y la latitud en 19 poblaciones de *C. lilloi* con distribución natural en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano-Boliviana



El decrecimiento continuo de la riqueza específica, en sentido Norte-Sur, también fue documentado para los bosques montanos de Bolivia (Kessler & Beck 2001), observándose menor diversidad en la Selva Tucumano-Boliviana, respecto de bosques localizados hacia el Norte, en los Yungas, siendo no obstante mayor que la observada en el Noroeste de Argentina (Kessler *et al.*, 2000). Dicha disminución es más marcada en la zona de transición de los bosques de los Yungas Bolivianos a bosques Tucumano-Bolivianos, localizada en el departamento de Santa Cruz (Ibisch *et al.*, 1996; Kessler *et al.*, 2000). Asimismo, Kessler & Beck (2001) sugieren que la zona directamente al sur del “Codo andino” presenta menos endemismos botánicos que zonas tanto más al norte como más al sur.

Los patrones de diversidad genética observados en las poblaciones bolivianas son consistentes con las características estructurales de las selvas montanas descritas para Bolivia. Las poblaciones Comarapa (Sur de los Yungas, 17° LS) y Entre Ríos (Sur de la Selva Tucumano-Boliviana en Tarija, 21° LS), presentaron los mayores niveles de diversidad con valores de 0.143 y 0.142, respectivamente. Por otra parte, el sistema de Selvas subtropicales que ocupa la ACRB en Argentina, continúa en el Sur de Bolivia por los departamentos de Tarija y Chuquisaca, conformando una sola unidad biogeográfica y ecológica (Brown *et al.*, 2001; Mueller *et al.*, 2002) y en este sentido el mayor nivel relativo de diversidad registrado en Entre Ríos, podría estar asociado también, a los mayores niveles de diversidad biológica observados en esta región. Las poblaciones cercanas al “Codo andino” (Samaipata, Vallegrande y Villa Serrano) mostraron menores valores de diversidad, si bien Samaipata presentó un mayor valor de LE. En concomitancia con la clasificación de sistemas ecológicos de los Andes del Norte y Centro, se señala que *C. lilloi* es una especie predominante en las ecosistemas Bosque montano pluviestacional subhúmedo de los Yungas y Bosques húmedos subandinos Boliviano-Tucumanos, que ocupan en Bolivia la zona Centro-Sur (NatureServe, 2009; Josse *et al.*, 2009).

No obstante la disposición geográfica de las poblaciones, sus niveles de diversidad genética están adicionalmente vinculados a la historia de uso y accesibilidad a las mismas. La población Samaipata, con el menor valor de diversidad en Bolivia, registra un aprovechamiento forestal intensivo por aserraderos no menor a 25 años, mientras que en la población de Entre Ríos, con alto nivel de diversidad, los pobladores restringen y norman el uso de *C. lilloi*, solo para destino local y debidamente autorizada por la directiva de la comunidad, prohibiendo su comercialización desde hace más de 20 años (Aguirre 2011, com. pers.). Asimismo, Comarapa se encuentra resguardada en el Parque Nacional Amboró y Área Natural de Manejo Integrado, cuya fecha de creación data del año 1973, con una ampliación realizada en 1991. Del mismo modo, en el área más diversa de Argentina (ACRB), los menores valores de diversidad genética fueron registrados en poblaciones disturbadas, tales como la Empresa 3R y El Nogalar. Esta última, si bien localizada en una Reserva Nacional de reciente creación (año 2006), luego de la donación de tierras por Gasoducto Norandino S.A. a la Administración de Parques Nacionales, presenta alta accesibilidad, cercanía a zonas urbanizadas y áreas de aprovechamiento forestal, con anterioridad a su creación. Situación similar reviste el PN Calilegua, creado en 1979, presentando una historia de uso vinculada a la actividad ganadera y a una intensa explotación forestal. Por el contrario el PN Baritú, creado en 1974, se encuentra localizado en un área rodeada de accidentes geográficos, que dificultan su acceso, siendo el PP La Florida (Tucumán) una de las Áreas Protegidas más antiguas de Argentina, creada en el año 1936.

Diferenciación genética

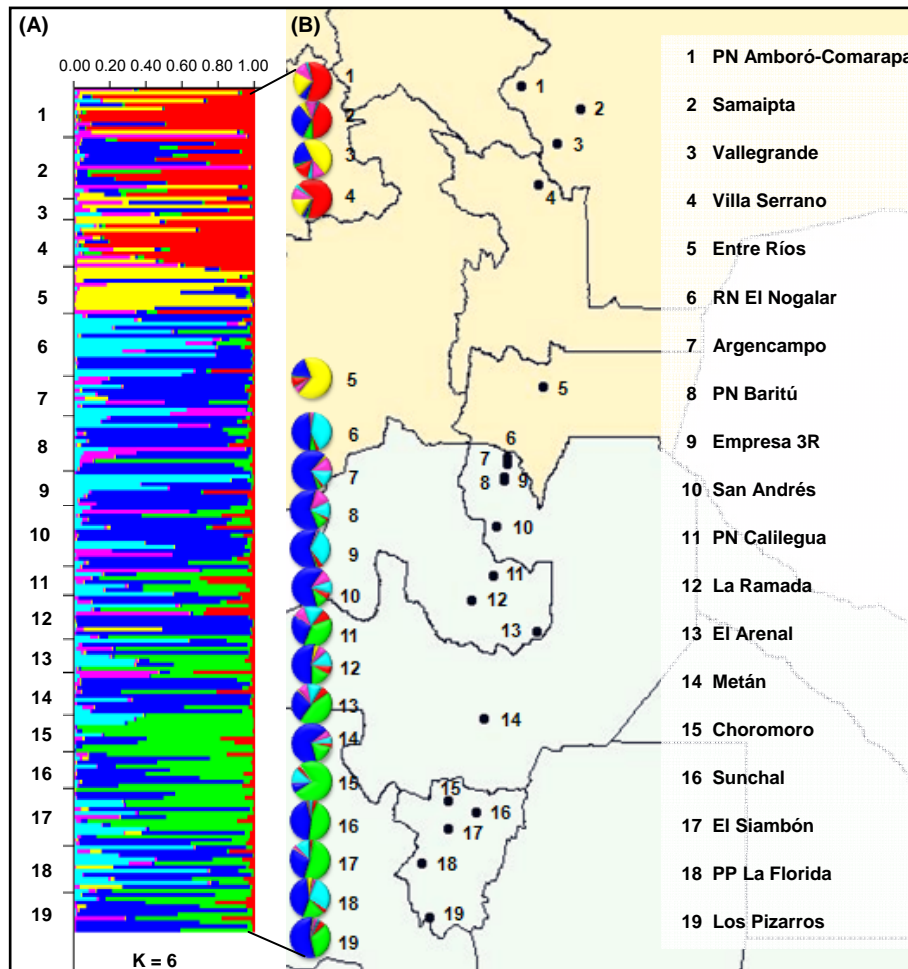
La distribución de la diversidad genética (AMOVA) presentó una diferenciación moderada y altamente significativa entre poblaciones ($\Phi_{pt} = 0.15$; $p \leq 0.001$, siendo Φ_{pt} análogo de F_{st}), manteniendo la mayor parte de la varianza total dentro de las poblaciones (85%) (Tabla 4), como es esperable en especies longevas, perennes, preponderantemente alógamas y leñosas (Hamrick *et al.*, 1992).

Tabla 4: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado sobre 19 poblaciones de *C. lilloi*, con distribución natural en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano-Boliviana

Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Variación (%)
Entre Poblaciones	18	1221.096	4.023	15
Dentro de Poblaciones	197	4386.054	22.264	85
Total	215	5607.150	26.287	100

El análisis de estructura poblacional, por métodos de agrupación Bayesiana (Structure 2.3.3) permitió distinguir un número óptimo de 6 grupos genéticos o *clusters* (K), luego de aplicar la metodología de Evanno *et al.*, (2005). La asignación de individuos a los grupos genéticos detectados, para la totalidad de poblaciones analizadas, refleja cambios entre los sitios muestreados en Bolivia respecto de los muestreados en Argentina, aún cuando la diferenciación genética entre poblaciones fue moderada (15%). Los grupos genéticos y su distribución geográfica se esquematizan en la Figura 3, a través de 6 colores diferentes.

Figura 3: Estructura genética de 19 poblaciones de *C. lilloi* con distribución en los Yungas Bolivianas y la Selva Tucumano-Boliviana, mediante métodos de agrupación Bayesiana. (A) Las barras coloreadas indican la fracción de los grupos genéticos estimados (K = 6) en cada individuo; (B) Las esferas coloreadas indican la proporción de los grupo genético asignada a cada población



PN: Parque Nacional; RN: Reserva Nacional; PP: Parque Provincial

La distribución de grupos genéticos entre las poblaciones bolivianas, mostró mayor relación entre las poblaciones Comarapa, Samaipata y Villa Serrano, así como entre las poblaciones de Vallegrande y Entre Ríos, a pesar de la distancia geográfica que separa estas dos últimas. El tamaño poblacional de Vallegrande es de solo 6 individuos, mientras que las restantes poblaciones bolivianas registran un promedio de 13 individuos, factor que puede estar explicando estas diferencias. Por otra parte, Entre Ríos y la RN El Nogalar presentan una distribución de *clusters* diferente, estando a una distancia aproximada de solo 100 km. En este sentido y a los fines de una descripción más precisa de la distribución de *pools* genéticos entre estas poblaciones, se requiere del muestreo de sitios intermedios entre algunas poblaciones (Villa Serrano, Entre Ríos y RN El Nogalar) que considere además, la disposición de los cordones andinos, los que presentan una distribución naturalmente aislada.

La distribución de grupos genéticos entre las poblaciones argentinas manifestó una tendencia congruente con la localización geográfica en cada Sector Latitudinal, a pesar de que fue observada una diferenciación genética baja Entre Sectores Latitudinales ($\Phi_{rt} = 0.04$;

$p \leq 0.001$), cuando el AMOVA fue realizado bajo tres niveles jerárquicos de estructura. En este análisis se registró además, una moderada diferenciación Entre Poblaciones/Dentro de Sectores Latitudinales ($\Phi_{pr} = 0.08$; $p \leq 0.001$), explicándose un 88% de la varianza total dentro de las poblaciones (Tabla 5).

Tabla 5: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) bajo tres niveles jerárquico de estructura, realizado sobre 14 poblaciones de *C. lilloi*, con distribución natural en la Selva Tucumano-Boliviana de Argentina

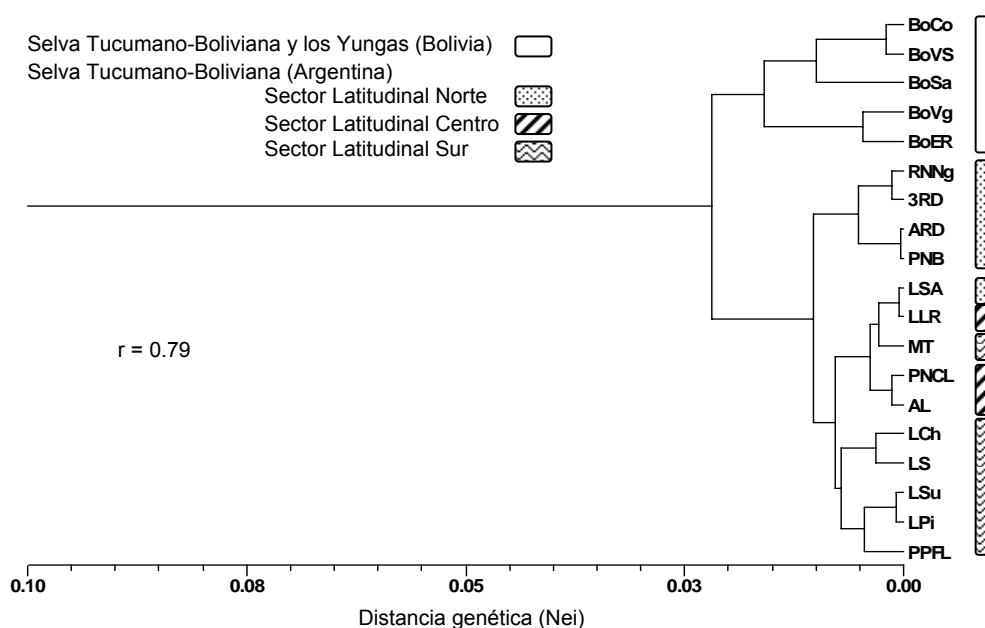
Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Variación (%)
Entre Sectores Latitudinales del NOA	2	164.621	0.832	4
Entre Poblaciones/Dentro de Sectores	11	447.326	1.813	8
Dentro de Poblaciones	144	2927.742	20.332	88
Total	157	3539.689	22.977	100

La población del PP La Florida (Tucumán) presentó una distribución de *clusters* más semejante a la observada en las poblaciones localizadas en el Sector Latitudinal Norte, en consistencia con la interpretación realizada por Brown (1986) y Brown *et al.*, (2001), quienes indican que la ACRB, al igual que las laderas húmedas de la Sierra del Aconquija en Tucumán (donde se localiza el PP La Florida) posiblemente se han comportado como un refugio de biodiversidad durante el Pleistoceno. Estos resultados son consonantes con los reportados para la especie en Argentina, bajo el desarrollo de sistemas de detección tradicional de marcadores moleculares (Inza, 2010).

Distancia Genética

El dendrograma resultante del agrupamiento de poblaciones (UPGMA) sobre la base de distancias genéticas poblacionales, al igual que el análisis de estructura genética, indica la distinción de dos grandes grupos, conforme a las poblaciones muestreadas en Bolivia y Argentina (Figura 4). En las poblaciones argentinas, si bien se observa una tendencia de agrupamiento por Sectores Latitudinales, este agrupamiento se manifiesta con mayor claridad para las poblaciones localizadas hacia los extremos Norte y Sur del ecosistema en el NOA.

Figura 4: Dendrograma correspondiente al análisis de agrupamiento (UPGMA) de 19 poblaciones de *C. lilloi*, con distribución natural en los Yungas Bolivianos y la Selva Tucumano-Boliviana, a partir de marcadores fAFLP



Cedrela balansae

Transferencia, selección y validación de SSRs

Fueron amplificados satisfactoriamente 24 putativos *loci*. La transferencia de los *primers* heterólogos fue evaluada conforme al nivel de polimorfismo detectado y a la aptitud de resolución de los patrones de identificación genética en *C. balansae*, permitiendo la selección preliminar de 11 SSRs, 8 aislados en *C. odorata* (Ced2, Ced4a, Ced18, Ced27, Ced41, Ced44, Ced61a, Ced95) y 3 en *C. fissilis* (CF26, CF66, CF78), para los que fueron optimizadas las condiciones de amplificación y detección de fragmentos en secuenciador automático (Soldati 2010). La validación de marcadores respecto a la presencia de alelos nulos, desequilibrio de ligamiento entre *loci* y endogamia, permitió la selección final de marcadores. Si bien se detectó la presencia de alelos nulos en nueve de los once marcadores, solo se alcanzaron valores mayores a 0.05 en los *loci* Ced4a, Ced18, Ced27 y CF26, con frecuencias de 0.89, 0.29, 0.18 y 0.30, respectivamente, debiendo ser excluidos los cuatro *loci* de los subsiguientes análisis. Para los 7 *loci* restantes (Tabla 6), la proporción de alelos nulos por *locus* fue menor a 0.05, en todos los casos, observándose ausencia de desequilibrio de ligamiento entre ellos ($P > 0.05$). Los coeficientes de endogamia promedio *Fis* (0.021) y *Fit* (0.026) indicaron un reducido grado de deficiencia de genotipos heterocigotas, respecto de las proporciones esperadas en el EHW. El valor promedio del estadístico *Fst* (0.049) indicó un nivel bajo de subdivisión poblacional.

El conjunto descripto de 7 SSRs fue finalmente seleccionado para la estimación de los respectivos parámetros de diversidad genética intra e interpoblacional. Estos marcadores permitieron detectar un total de 62 alelos, presentes en un rango variable de 5 a 16 alelos para los *loci* Ced61 y Ced44, respectivamente, con un valor medio de 8.85 alelos, a través de los *loci* analizados. Se destacan los *loci* Ced44, Ced95 y CF78, por ser altamente informativos para la genotipificación de la especie, presentando valores de *He* de 0.840, 0.835 y 0.801, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6: Parámetros estadísticos descriptivos de 7 marcadores SSRs transferidos a *C. balansae*. Se indican para cada *Locus*: Número de alelos detectados (Na), Frecuencia de alelos nulos (AN), Coeficiente de endogamia (*Fis*), Coeficiente de diferenciación genética (*Fst*), Coeficiente de endogamia total (*Fit*), Heterocigosidad observada (*Ho*), Heterocigosidad esperada (*He*) y desvío estándar (ds)

Locus	Na	AN	Fis	Fst	Fit	Ho	He
Ced2	6	0.023	-0.094	0.031	-0.060	0.632	0.593
Ced41	6	0.015	0.018	0.105	0.121	0.616	0.692
Ced44	16	0.000	-0.062	0.019	-0.042	0.877	0.840
Ced61	5	0.043	0.041	0.032	0.071	0.471	0.505
Ced95	13	0.000	-0.071	0.026	-0.043	0.873	0.835
CF66	8	0.006	0.006	0.051	0.057	0.433	0.456
CF78	8	0.026	0.019	0.083	0.100	0.728	0.801
Promedio	8.85	0.016	0.021	0.049	0.026	0.622	0.675
ds.	4.09	0.020	0.051	0.034	0.071	0.182	0.163

Diversidad genética

La caracterización molecular de las 8 poblaciones (107 individuos) permitió identificar 13 alelos exclusivos (*Ae*) distribuidos en siete de las ocho poblaciones analizadas. Los valores promedio de heterocigosidad fueron consistentes a través de las distintas poblaciones, sin presentar importantes diferencias entre las poblaciones localizadas en los SLN y SLC, descriptos para la Selva Tucumano-Boliviana del NOA (Tabla 7).

El valor promedio de Heterocigosidad Observada (*Ho*) fue de 0.660, presentando un valor mínimo de 0.602 para Yuto y un valor máximo de 0.726 para PN Calilegua. La Heterocigosidad esperada insesgada (*He*) promedio (Diversidad genética de Nei), a través del total de poblaciones, fue moderada con un valor de 0.643, observándose un rango de variación de 0.575 a 0.683 para las poblaciones Apolinario Saravia y PN Calilegua, respectivamente (Tabla 7). Las poblaciones con mayores niveles de diversidad genética corresponden al PN Calilegua, San Andres y Acambuco (Soldati *et al.*, 2010).

Tabla 7: Diversidad genética de 8 poblaciones naturales de *C. balansae*, distribuidas en el Noroeste argentino. Se indican para cada población: Nombre y Código de identificación (CI), Número de alelos exclusivos (Ae), Heterocigosidad observada (*Ho*), Heterocigosidad esperada inesgada (*He*) y desvío estándar (ds)

Población	CI	N	Ae	<i>Ho</i>	<i>He</i>
Acambuco	ACAMB	16	3	0.723	0.664
Piquirenda	PIQUIR	15	1	0.703	0.620
Río Seco (FF)	RSFF	10	3	0.643	0.622
Río Seco (FSB)	RSFSB	17	0	0.647	0.645
San Andrés	SA	12	1	0.618	0.663
Yuto	YUTO	16	2	0.602	0.645
PN Calilegua	PNC	12	2	0.726	0.683
Apolinario Saravia	AS	9	1	0.619	0.575
Promedio		13.375	1.625	0.660	0.643
ds.		3.020	1.408	0.029	0.026

Los niveles de diversidad observados en la especie, evidenciaron valores relativamente menores a los documentados en otras especies del género, tales como *C. odorata* (Hernández Sánchez *et al.*, 2008) y *C. fissilis* (Kageyama *et al.*, 2004). El número de marcadores SSRs sobre los que se sustentaron los resultados podría considerarse insuficiente para reflejar los niveles de diversidad intrapoblacional, atendiendo en particular a que solo 3 de los *loci* examinados presentaron alta capacidad discriminatoria. Sin embargo, se obtuvieron resultados similares cuando el análisis genómico de las poblaciones se realizó sobre 388 *loci* polimórficos de fAFLPs (Soldati *et al.*, 2010), confirmando los resultados obtenidos mediante el conjunto de 7 SSRs seleccionado.

Los niveles moderados de diversidad genética sugieren su asociación a una reducida área de distribución geográfica de la especie, que en Argentina, está comprendida entre las coordenadas 22° - 24° LS y 63° - 64° O, abarcando solo una quinta parte de la superficie que ocupa *C. lilloi*, en este país. Es de considerar además, que *C. balansae* presenta restricciones de distribución por la altitud, debido a su susceptibilidad a bajas temperaturas, y por requerimientos de humedad. Asimismo, es de destacar que la especie no ha sido descrita entre las especies de *Cedrela* con ocurrencia en los sistemas ecológicos de Bolivia (Toledo *et al.*, 2008), encontrándose sólo una referencia en Chiquitos (Santa Cruz) a través de los registros publicados por el Missouri Botanical Garden. Estos registros ubican a la especie en Paraguay, habiendo sido referenciada una aceción con origen en este país, a través de estudio de ITS en la especie (Muellner *et al.*, 2009).

El grado de disturbio generalizado que reviste la Selva Pedemontana, donde ocurre *C. balansae*, constituye un factor adicional de directa incidencia en los niveles de diversidad genética. El conjunto de poblaciones analizadas cubre la casi totalidad de su área de distribución en Argentina, de tal modo que los resultados obtenidos podrían considerarse representativos del actual estado de conservación del recurso forestal. Como tal, la variabilidad presente dentro de las poblaciones es moderada, siendo menor hacia el extremo sur del área de distribución natural. Conforme a este patrón, la población de Apolinario Saravia, localizada en el extremo marginal (umbral al Chaco) de distribución de la especie en Salta (Argentina), presentó el valor más bajo de diversidad genética.

Diferenciación genética

La estructura genética poblacional fue estimada mediante un AMOVA, considerando tres componentes de la varianza (Entre Poblaciones, Entre Individuos/Dentro de Poblaciones y Dentro de los individuos). Este análisis evidenció una diferenciación genética baja y altamente significativa entre poblaciones, con un valor del estadístico *Fst* de 0.049 ($p \leq 0.001$), estimación también indicada en la validación de los *loci* examinados (Tabla 6). La mayor parte de la varianza (95%) se debió a la variación genética dentro de los individuos, no observándose variación genética entre los individuos dentro de las poblaciones (Tabla 8). Estos resultados son consistentes con análisis desarrollados en las mismas poblaciones sobre marcadores morfométricos al segundo ciclo de crecimiento a campo, tales como altura y DAC (Diámetro a la Altura de Cuello), no habiéndose evidenciado diferencias significativas entre procedencias a edad temprana (Fornes 2010, com. pers.)

Tabla 8: Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) realizado sobre ocho poblaciones naturales de *C. balansae*, con distribución natural en la Selva Tucumano-Boliviana de Argentina

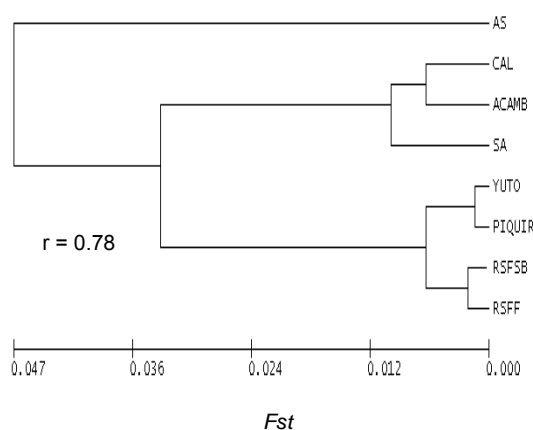
Fuentes de Variación	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Variación (%)
Entre Poblaciones	7	37.789	0.118	5
Entre Individuos/Dentro de poblaciones	99	224.865	0.001	0
Dentro de Individuos	107	245.000	2.290	95
Total	213	507.654	2.407	100

El flujo génico histórico, estimado de manera indirecta a partir del estadístico F_{st} (0.049), presentó un valor de $Nm = 3.71$, indicando la presencia de un flujo génico moderado-alto entre las poblaciones de *C. balansae* analizadas, lo que favorece una baja diferenciación genética entre poblaciones, tal como lo indican los resultados obtenidos. A pesar de la fragmentación de los bosques, ésta no parece haber tenido un impacto severo en el flujo génico, condición que puede estar ligada al tipo de polinización entomófila (Kageyama *et al.*, 2004), descrita en especies del mismo género y familia (revisión Ward *et al.*, 2005; Aschero 2006).

Distancia genética

La estimación de las distancias genéticas entre la totalidad de individuos y el correspondiente análisis de agrupamiento, indicaron ausencia de grupos definidos tanto por población como por localización geográfica (figura no presentada). Asimismo, el análisis de agrupamiento (UPGMA) por poblaciones, consideradas de a pares a través de los estadísticos F_{st} , denotó la falta de asociación de las poblaciones respecto a su posición geográfica en los SLN y SLC del NOA (Figura 5). De esta manera se observó la agrupación de poblaciones que localizadas en distintos sectores fueron reunidas en un mismo *cluster*, tales como Acambuco (extremo Norte del SLN) y PN Calilegua (SLC). Se distingue, no obstante un bajo valor de diferenciación ($F_{st} = 0.047$), la población Apolinario Saravia respecto de las poblaciones restantes, señalando su localización marginal, en el límite Sur-Este de distribución.

Figura 5: Dendrograma correspondiente al análisis de agrupamiento (UPGMA) de 8 poblaciones naturales de *C. balansae*, con distribución en la Selva Tucumano-Boliviana (NOA), a partir de 7 marcadores SSRs



CONCLUSIONES

El patrón de distribución de la diversidad genética en *C. lilloi*, está asociado principalmente al patrón de variación latitudinal, inherente a la Selva Tucumano-Boliviana, con valores crecientes de diversidad hacia latitudes menores, en Bolivia. Este gradiente latitudinal de la diversidad guarda relación con el patrón general de distribución de la diversidad taxonómica en la ecoregión.

Los niveles de diversidad genética en *C. balansae* están asociados a una reducida área de dispersión natural de la especie en Argentina, presentando baja diferenciación entre sus poblaciones como resultado de un flujo genético considerable y de la ausencia de un agrupamiento espacial de las poblaciones, resultados concordantes con los indicados para análisis basados en marcadores morfométricos.

Los niveles actuales de diversidad genética, para ambas especies, están adicionalmente vinculados a la accesibilidad e historia de uso de las poblaciones, así como al estado de disturbio de los sectores aprovechados en las Áreas Protegidas, con anterioridad a su creación.

Gran parte de las poblaciones que denotaron mayores niveles de diversidad genética se encuentran actualmente resguardadas en Áreas Protegidas, no obstante son de contemplar aquellas poblaciones localizadas en los extremos de distribución y en áreas de conectividad entre distintas zonas.

Se sugiere la intensificación de sitios de muestreos en Bolivia para *C. lilloi* y en áreas de distribución natural que aún no han sido exploradas en ambas especies.

El presente trabajo se realizó en el marco de la Carta de Entendimiento Bioersity International-INTA-CIAT, de Proyectos Nacionales del INTA [PNFOR4233 “*Domesticación de especies del género Cedrela para su cultivo en las selvas subtropicales argentinas*” y AEBIO1432 “*Desarrollo y adaptación de marcadores moleculares apropiados para asistir el mejoramiento de especies de importancia productiva*”] y del Proyecto BIRF-LN-7520-AR “*Manejo Sustentable de Recursos Naturales, Componente 2, Plantaciones Forestales Sustentables, Subprograma Cedrela*”

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aschero V. 2006. Biología reproductiva e importancia de la polinización en *Cedrela lilloi*. En: Ecología y Producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes. Pacheco S., Brown A. (eds), pp. 41-50. LIEY-ProYungas, Tucumán, Argentina.
- Bonin A., Ehrich D., Manel S. 2007. Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology* 16: 3737-3758.
- Brown A. D. 1986. Autoecología de bromelias epífitas y su relación con *Cebus apella* (Primates) en el noroeste argentino. Tesis doctoral, UNLP. Argentina. 474 pp.
- Brown A.D., Grau R. H., Malizia L. R. & Grau A. 2001. Argentina. En: Bosques nublados del neotrópico. Kappelle M., Brown A. (eds). INBio, Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, pp: 623-659.
- Brown A. D. & Malizia L. R. 2004. Las Selvas Pedemontanas de las Yungas. En el umbral de la extinción. *Ciencia Hoy* 14 (83): 53-63.
- Brown A. D., Pacheco S., Lomáscolo T. & Malizia L. 2006. Situación Ambiental en los Bosques Andinos Yungueños. En: La situación ambiental argentina 2005. A. Brown, U. Martínez Ortiz, M. Acerbi, J. Corchera (eds), Fundación Vida Silvestre Argentina, Buenos Aires, Argentina, pp: 52-71
- Cabrera A. L. 1994. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Regiones Fitogeográficas Argentinas. Editorial ACME, Tomo II, Fascículo 1. Buenos Aires, Argentina.
- Cavers S., C. Navarro & A. J. Lowe. 2003. A combination of molecular markers identifies evolutionary significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics* 4: 571-580.
- Cavers S., Degen B., Caron H., Lemes M., Margis R., Salgeueiro F., Lowe A. J. 2005. Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity* 95: 281-289.
- Crow J.F. & Aoki K. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population's subdivision, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 81:6073-6077.
- De la Sota E. R. 1972. Sinopsis de las Pteridófitas del Noroeste de Argentina. *Darwiniana* 17:11-103.
- De la Torre A., C. López, E. Yglesias, J. P. Cornelius. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management* 255:334-339
- Doyle J. J. & Doyle J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Evanno G., S. Regnaut & J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Falush D., M. Stephens & J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*. 7: 574-578

- Gándara F.B. 2009. Diversidade genética de populações de Cedro (*Cedrela fissilis* Vell. Meliaceae) no Centro-Sul do Brasil, Tesis Doctoral, Escuela Superior de Agricultura, Universidad de San Pablo, Brasil.
- Gentry A. H. 2001. Patrones de diversidad y composición florística en los bosques de las montañas neotropicales. En: Bosques nublados del neotrópico. Kappelle M., Brown A. (eds). INBio. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, pp: 85-123
- Gillies A. C. M., C. Navarro, A. J. Lowe, A. C. Newton, M. Hernández, J. Wilson & J. P. Cornelius. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity* 83: 722-732.
- Grau H.R. 2000. Regeneration patterns of *Cedrela lilloi* (Meliaceae) in northwestern Argentina subtropical montane forests. *Journal of Tropical Ecology* 16: 227-242.
- Grau H.R., T.A. Easdale & L. Paolini. 2003. Subtropical dendroecology - dates disturbances and forest dynamics in northwestern Argentina montane ecosystems. *Forest Ecology and Management* 177:131-143.
- Grau H. R. & M. Aide. 2008. Globalization and land-use transitions in Latin America. *Ecology and Society* 13(2): 16.
- Hamrick J. L., Godt M., Sherman-Broyles S. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hernández Sánchez L.G. 2008. Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscapes and primary forests, Tesis *Magister Scientiae* en Manejo y Conservación de Bosques Naturales y Biodiversidad, Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica.
- Hernández Sánchez G., A. Buonamici, K. Walker, G. G. Vendramin, C. Navarro, S. Cavers. 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cedrela odorata* L. (Meliaceae), a high value neotropical tree. *Conservation Genetics* 9 (2): 457-459.
- Hollingsworth P. & Ennos R. A. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92: 490-498.
- Ibisch P.L., Rojas P., de la Barra N., Fernández E., Mercado M., Ovando L., Vargas G. 1996. Un "lugar de encuentro": Flora de la zona arqueológica "El Fuerte", Samaipata (Prov. Florida, Dto Santa Cruz, Bolivia). *Ecología en Bolivia* 28: 1-28.
- Inza V., Zelener N., Fornes L., Hernández M., Gallo L. 2008. Molecular Genetic Diversity in Native Fragmented Populations of *Cedrela lilloi* from the Northwest of Argentine. *Biocell* 32 (2): pag A83. Tucuman Biology Association. Abstracts from the XXIV Annual Scientific Meeting, Nov. 8-9, 2007, Tafi del Valle, Tucumán, Argentina. <http://www3.cricyt.edu.ar/biocell>.
- Inza M.V., Zelener N., Fornes L., & Gallo L. 2009. Variación latitudinal y efecto de la explotación forestal sobre la diversidad genética de *Cedrela lilloi* en el Noroeste argentino. XIIIº Congreso Forestal Mundial. 18-23 de Octubre de 2009. Buenos aires. Argentina.
- Inza M.V. 2010. Diversidad Genética Molecular de Poblaciones Nativas de *Cedrela lilloi* del Noroeste Argentino. Tesis *Magister Scientiae* en Recursos Naturales. Escuela para Graduados Alberto Soriano. FAUBA. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.
- IUCN Red List of Threatened Species. URL <http://www.iucnredlist.org>
- Josse C., Cuesta F., Navarro G., Barrena V., Cabrera E., Chacón-Moreno E., Ferreira W., Peralvo M., Saito J. & Tovar A. 2009. Mapa de Ecosistemas de los Andes del Norte y Centro. Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional ECOBONA, CONDESAN-Proyecto Páramo Andino, Programa BioAndes, EcoCiencia, NatureServe, LTA-UNALM, IAvH, ICAE-ULA, CDC-UNALM, RUMBOL SRL. Lima. UTL: <http://www.infoandina.org>
- Juárez A., P. Ortega-Baes, S. Sühling, W. Martin & G. Galíndez. 2007. Spatial patterns of dicot diversity in Argentina. *Biodiversity and Conservation* 16:1669-1677.
- Kageyama P., Sebben A.M., Ribas L.A., Gandara B.F., Castellen M., Percim M.B., Vencovsky R. 2003. Diversidade genética em espécies arbóreas tropicais de diferentes estágios sucessionais por marcadores genéticos. *Scientia Forestalis* 64: 93-107.
- Kageyama P., D. Caron, F. Gandara, & J. Dagoberto do Santos. 2004. Conservation of Mata Atlântica forest fragments in the State of São Paulo, Brazil. In: Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil. Vicenti, B., W. Amaral and B. Meilleur (eds).IPGRI, Rome, Italy. Chapter 9: 167-185.
- Kessler M., Krömer T., Jiménez I. 2000. Inventario de grupos selectos de plantas en El Valle de Masicurí (Santa Cruz, Bolivia). *Revista Boliviana de Ecología y Conservación Ambiental* 8: 3-15.
- Kessler M. & Beck S.G. 2001. Bolivia. En: Bosques nublados del neotrópico. Kappelle M. & Brown A. (eds). INBio. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, pp: 581-622.
- Kremer A., Caron H., Cavers S., Colpaert N., Gheysen G., Gribel R., Lemes M., Lowe A. J., Margis R., Navarro C., Salgueiro F. 2005. Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity* 95: 274-280.
- Lewis P.O. & D. Zaykin. 2002. Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.1 . URL : <http://lewis.eeb.uconn.edu/lewishome/>
- Malizia L., Blundo C., Pacheco S. 2006. Diversidad, estructura y distribución de bosques con cedro en el noroeste de Argentina y sur de Bolivia. En: *Ecología y Producción de cedro (género Cedrela) en las Yungas australes*. Pacheco S., Brown A. (eds). LIEY-ProYungas, Tucumán, Argentina. pp: 83-104
- Missouri Botanical Garden. URL: <http://www.tropicos.org>.

- Minetti J. M. 2006. Aprovechamiento forestal de cedro en las Yungas de Argentina. En: Ecología y Producción de cedro (género *Cedrela*) en las Yungas australes. Pacheco S., Brown A. (eds). LIEY-ProYungas, Tucumán, Argentina. pp: 143-154
- Mostacedo B. & Todd S. Fredericksen. 2000. Estado de Regeneración de Especies Forestales Importantes en Bolivia: Evaluación y Recomendaciones. Documento Técnico 88/2000. Proyecto de Manejo Forestal Sostenible. BOLFOR.
- Mueller R., S. G. Beck & R. Lara. 2002. Vegetación potencial de los bosques de Yungas en Bolivia, basado en datos climáticos. *Ecología en Bolivia* 37(2):5-14.
- Muellner A. N., Pennington T. D, Chase M. W. 2009. Molecular phylogenetics of Neotropical Cedreleae (mahogany family, Meliaceae) based on nuclear and plastid DNA sequences reveal multiple origins of "Cedrela odorata". *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 461-469
- NatureServe. 2009. International Ecological Classification Standard: Terrestrial Ecological Classifications. Sistemas Ecológicos de los Andes del Norte y Centro. NatureServe Central Databases. Arlington, VA. URL: <http://www.natureserve.org>
- Navarro C., S. Cavers, A. Pappinen, P. Tigerstedt, A. Lowe, & J. Merilä. 2005. Contrasting Quantitative Traits and Neutral Genetic Markers for Genetic Resource Assessment of Mesoamerican *Cedrela odorata*. *Silvae Genetica* 54(6): 281-292.
- Navarro, G. & M. Maldonado. 2002. Geografía Ecológica de Bolivia. Vegetación y Ambientes Acuáticos. Editorial Centro de Ecología Simon I. Patino. Cochabamba. 719 p.
- Navarro G. & Ferreira W. 2004. Zonas de vegetación potencial de Bolivia: Una base para el análisis de vacíos de conservación. *Revista Boliviana de Ecología* 15: 1-40.
- Nei M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings Natural Academy of Science* 70: 3321-3323.
- Patiño Varela F. 1997. Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los Neotrópicos: Propuestas para Acciones Coordinadas. Dirección de Recursos Forestales. Departamento de Montes. FAO. Roma, Italia.
- Peakall R. & P.E. Smouse. 2006. GENALEX6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295. URL: <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- Pennington T.D, & Muellner A. N. 2010. A monograph of *Cedrela* (Meliaceae). dh books. Distributed by Missouri Botanical Garden Press.
- Pritchard J. K., M. Stephens & P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Programa ONU-REDD Bolivia. 2010. Documento del Programa Nacional Conjunto-Bolivia. UN-REDD/PB4/4ai/SPA. Programa de Naciones Unidas para la Reducción de las Emisiones de la Deforestación y Degradación del Bosque en los países en Desarrollo. Documento del Programa Nacional Conjunto.
- Rohlf F.J. 1998. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, v 2.11w. Exeter Publishing, Ltd.: Setauket, NY.
- Rousset F. 2008. Genepop Version 4.0: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- SAYDS. 2007. Primer Inventario Nacional de Bosques Nativos. Informe Regional Selva Tucumano Boliviana. Proyecto Bosques Nativos y Áreas Protegidas BIRF 4085-AR. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación. 1ºed. Buenos Aires. Argentina.
- Soldati M. C. 2010. Evaluación de la diversidad genética de poblaciones naturales de Cedro Orán (*Cedrela balansae*) en la Selva Tucumano-Boliviana, mediante Marcadores moleculares neutros. Tesis de Licenciatura en Genética. Universidad de Morón. Buenos Aires. Argentina
- Soldati M. C., Fornes L., van Zonneveld M. & Zelener N. 2010. Diversidad genética molecular de *Cedrela balansae* (Meliaceae) en las Yungas (Selva Tucumano-Boliviana) del Noroeste Argentino. 1º Congreso Latinoamericano (IV Argentino) de Conservación de la Biodiversidad, 22-26 de Noviembre de 2010, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina
- Tautz D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6471.
- Toledo M., B. Chevallier, D. Villarroel, B. Mostacedo. 2008. Ecología y silvicultura de especies menos conocidas. Cedro, *Cedrela* spp. Proyecto BOLFOR II/Instituto Boliviano de Investigación Forestal. Santa Cruz, Bolivia.
- UMSEF, SAYDS. 2007. Informe sobre Deforestación en Argentina. URL: <http://www.ambiente.gov.ar>
- Vekemans X., T. Beauwens, M. Lemaire & I. Roldán-Ruiz. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology* 11:139-151.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, & M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.
- Wright S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* 15:323-354.
- Ward M., C. W. Dick, R. Gribel & A. J. Lowe. 2005. To self, or not self... A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. *Heredity* 95: 246-254.
- Zapater M. A., E. M. Del Castillo & T. D. Pennington. 2004. El Género *Cedrela* (Meliaceae) en la Argentina. *Darwiniana* 42(1-4): 347-356.
- Zelener N., Tosto D., Soldati M.C., Inza M.V. & Fornes L. 2010. Identificación Genética Molecular de las Especies de *Cedrela* de las Yungas, mediante ITS y AFLP. 1º Congreso Latinoamericano (IV Argentino) de Conservación de la Biodiversidad, 22-26 de Noviembre de 2010, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.