

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE TRES VIVEROS DE  
PALMA DE CERA (*Ceroxylon quindiuense*) (H.Karst.) H.Wendl  
EN EL DEPARTAMENTO DEL QUINDÍO**

**KATHERINE CHACÓN VARGAS**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA, COLOMBIA  
Abril, 2015**

**EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE TRES VIVEROS DE  
PALMA DE CERA (*Ceroxylon quindiuense*) (H.Karst.) H.Wendl EN EL  
DEPARTAMENTO DEL QUINDÍO**

**KATHERINE CHACÓN VARGAS**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de bióloga**

**MARÍA JOSÉ SANÍN PÉREZ *M.Sc. Ph.D***

**Director (a)**

**JOHAN LUDWIGVANN CARVAJAL HANRRYR**

**Co- director**

**UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS Y TECNOLOGÍAS  
PROGRAMA DE BIOLOGÍA  
ARMENIA QUINDÍO  
2015**

**NOTA DE ACEPTACIÓN:**

El trabajo de grado titulado “**Evaluación y caracterización genética de tres viveros de palma de cera (*Ceroxylon quindiuense*) en el departamento del Quindío**”, presentado por la estudiante **Katherine Chacón Vargas, C.C.:** 1.094.931.136, para optar al título de Biólogo, fue revisado y calificado por:



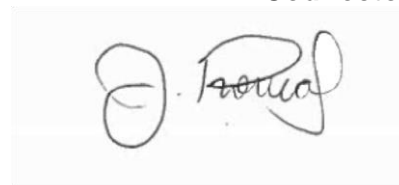
---

**María José Sanín Pérez M.Sc., Ph.D.**  
**Docente Investigador**  
**Universidad CES, Medellín**  
**Director**



---

**Johan Ludwigvann Carvajal Hanrryr B.Sc.**  
**Docente.**  
**Universidad del Quindío**  
**Codirector**



---

**Firma de Jurado (1)**

---

**Firma de Jurado (2)**

---

Armenia, Colombia, Abril de 2015

**DEDICATORIA**

A Dios, mi todo

A mis padres, mis grandes héroes y mi ejemplo a seguir

A mis hermanos, mis mejores amigos y mis cómplices de travesuras.

A mis abuelos, y a su fortaleza y sabiduría en la familia, en la vida

A mis grandes amigos, por los lazos que no se rompen ni con el tiempo ni con la distancia

A este pedacito de tierra que enamora, a sus majestuosos paisajes, a quienes trabajan la tierra con amor, a su cultura que llevo en mi carrera, en mi arte, en mi alma

A lo que vale realmente, lo esencial y que se aprecia con el corazón

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que colaboraron para la realización de esta tesis y sin las cuales no habría sido posible la terminación de la misma. Agradezco sus ideas, palabras consejos, guías, ánimos, enseñanzas y en general todos los aportes realizados para mi formación y trabajo.

Agradezco a Dios por ser mi sustento y guía en todo momento, a mis amados padres por su fortaleza y amor en el hogar en mi crianza, en mi formación personal a mis loquitos hermanitos, que aunque tengamos 80 años seguirán siendo “mis pequesitos” a Oliver, por la nobleza con la que siempre me mirará, a mis abuelitos que aunque no estén me dieron el mejor de los regalos, sus enseñanzas, y a mis adorados amigos, por su compañía y apoyo en cada paso en cada momento y que me han hecho la persona que soy.

Agradezco el apoyo de mi directora María José Sanín, por sus consejos, guía y confianza que ayudaron a formarme a nivel profesional y me enseñaron la labor de un investigador. También a mi Codirector Johan Carvajal por su amistad y enseñanza de la vida y de la profesión. De igual modo, gracias al apoyo a nivel organizacional y administrativo, a la Corporación Autónoma del Quindío CRQ por fomentar y financiar proyectos como este que abarquen la protección de nuestros recursos, al Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y en especial a Adriana Bohórquez y Patricia Zapata por su amistad y constante apoyo durante todo el proceso de investigación y por la enseñanza de que las cosas en la investigación se hacen con pasión y disciplina. Gracias a todas las maravillosas personas que conocí, Aura, Janeth, Eliana, Carlos, Enrique, Julieth, y a los que por mi mala memoria no nombro pero que van inmersos en cada palabra de agradecimiento.

A los que compartieron conmigo estos 5 años, maestros y compañeros que aportaron a mi crecimiento y son en parte responsables de mi amor por la Biología. A mis queridas niñas Roci, Naty, Moniquita, Carito Anita, Liz, por tantas

risas, alegrías, llantos en los que nos acompañamos y nos levantamos en momentos difíciles, y a las celebraciones de cada día por “nosotras”, por nuestros “atraverssiamos”, a mis amigos Mónica Sierra, Jeka Montoya, Edwin “Camilo”, Esteban, Ranito, Ronald, Mateo, Alejo Acosta, Osquitar y Juan por sus consejos y grandes momentos compartidos. A todos lo que acompañaron mi proceso de investigación y los que me siguieron en todas esas locuras que nos dan a los biólogos de conocer y apreciar lo que estudiamos...lo que vivimos.

A la danza por ser mi cómplice en momentos de crisis y de gran alivio, por ser ese espacio en el que podía ser yo, podía ser mi danza. A mis maestros Víctor Hugo López y Fabian Cortéz, por sus enseñanzas y el amor que me transmitieron de este pedacito de cielo, el Quindío, y me enseñaron que puedes hacer cualquier cosas si te apasiona, a mis compañeros de baile Dianita, Natali, Cristian, Esteban, Daniel, Alba, Maka, Choco, Lina, María, Leo, Yomar. A DANZAR por ser ese espacio donde nos une el amor al arte, el amor a nuestra tierra.

Estas últimas palabras son para ti mi querido sombrero, por los momentos de alegrías y llantos, para los libros compartidos y los que faltan, por la música que nos falta por escuchar, por los caminos que nos faltan por recorrer, por las frases que nos faltan por decir, por los mundos y palabras inventadas y sin inventar. Mi amado Víctor gracias por ser mi maestro, amigo y cómplice. Gracias por que cada lugar, cada palabra tiene un contexto “becuadro” que ira con nosotros a donde vayamos y nos hacen lo que somos el uno para el otro. Ten presente que “te encuentres donde te encuentres, cerca o lejos, si puedes leer esto que ahora te escribo, recuerda, recuérdame, recuérdanos así” (Rodrigo Fresan, El fondo del cielo”).

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	16
1.1. Consideraciones generales y esquema de la tesis	16
<b>2. ESTADO DEL ARTE</b>	19
2.1 Estado y conservación de <i>Ceroxylon quindiuense</i>	19
<b>3. MARCO TEÓRICO</b>	22
3.1 Efecto DE LA transformación del paisaje en la diversidad genética de las poblaciones	22
3.2 Programa de repoblamiento de especies silvestres	24
3.3 Reintroducción de individuos para la repoblación de hábitats naturales	25
3.4 Regeneración de los bosques naturales de palma de cera	28
2.1. Importancia del uso de marcadores moleculares microsatélites	29
<b>4. OBJETIVOS</b>	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos específicos	32
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	33
5.1 Poblaciones silvestres analizadas	33
5.1.1 Valle de Cocora, Quindío	33
5.1.2 Toche- La Ceja, Tolima	33
5.1.3 La Línea, Tolima	34
5.2 Viveros analizados	34
5.2.1 Viveros analizados	34
5.2.2 Jardín Botánico del Quindío	35
5.2.3 Milán	35
5.2.4 Roso	35
5.3 Selección del material vegetal	35
5.4 Análisis de marcadores moleculares microsatélites	36
5.4.1 Extracción de ADN	36

5.4.2	Selección y evaluación de marcadores microsatélites	36
5.4.3	Amplificación de los marcadores moleculares microsatélites	36
5.5	Análisis de datos	37
5.5.1	Diversidad genética de la población del Valle de Cocora y los viveros	37
5.5.2	Estructura genética poblacional y análisis de cercanía entre poblaciones e individuos	38
5.5.3	Análisis de parentesco	39
5.5.4	Análisis de Correspondencias Múltiples (ACM)	40
5.5.5	Identificación de individuos potenciales para el programa de repoblamiento	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b>	41
6.1	Microsatélites, frecuencias alélicas y número efectivo de alelos	41
6.2	Diversidad genética: viveros y la población silvestre de <i>Ceroxylon quinduense</i> (Valle de Cocora)	45
6.3	Heterocigosidad y contenido de información polimórfico (PIC)	46
6.4	Estructura genética poblacional entre viveros y poblaciones silvestres	49
6.4.1	Probabilidad de pertenencia	53
6.5	Patrones genéticos	54
6.5.1	Análisis de parentesco	56
6.5.2	Análisis de correspondencias múltiples (ACM)	58
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	61
7.1	Concordancia genética	62
7.2	Patrones genéticos entre poblaciones silvestres y viveros	63
7.3	Poblaciones silvestres	65
7.4	Relaciones de parentesco	66
7.5	Asociación por microsatélites	67
7.6	Conservación de la diversidad genética en poblaciones <i>ex situ</i> y efectividad de la repoblación con viveros	67
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	70
<b>9</b>	<b>IMPACTO ESPERADO</b>	71
<b>10</b>	<b>RECOMENDACIONES</b>	72
<b>11</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	73



<b>12 ANEXOS</b>	86
<b>11.1</b> Datos microsatélites y geles	86
<b>11.2</b> Participación en eventos académicos	90
<b>11.3</b> Socialización del trabajo: Informe para la Corporación autónoma CRQ	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frecuencia de alelos privados por loci en los viveros Jardín Botánico (JB), Milán (Mi), Roso (Ro) y la población del Valle de Cocora (Co)	46
<b>Figura 2.</b> Resumen de alelos en los 10 loci evaluados en las tres colecciones (JB- Jardín Botánico, Mi- Milán, Ro- Roso) y en la población del Valle de Cocora (Co). Azul número total de alelos, morado número de alelos con baja frecuencia (<5%), verde número alelos privados	48
<b>Figura 3.</b> Correlación entre la Heterocigosidad esperada y el número de alelos por locus	49
<b>Figura 4.</b> Representación gráfica del análisis discriminante de componentes principales DAPC de los 10 microsatélites en las 3 poblaciones silvestres y los 3 viveros de <i>Ceroxylon quinduense</i>	51
<b>Figura 5.</b> Representación gráfica de los alelos que contribuyen mayormente en la diferenciación de las poblaciones basándose en los resultados del DAPC	52
<b>Figura 6.</b> Representación gráfica de las probabilidades de pertenencia de cada individuo en los diferentes grupos evaluados	52

<b>Figura 7.</b> Representación gráfica de la composición genética de todos los individuos evaluados	54
<b>Figura 8.</b> Agrupamiento jerárquico entre poblaciones usando distancias de Nei (1973)	55
<b>Figura 9.</b> Agrupamiento jerárquico entre poblaciones usando distancias genéticas de Kosman y Leonard (2005)	56
<b>Figura 10.</b> Análisis de parentesco. Porcentaje de hermanos completos y porcentaje de hermanos medios por cada población evaluada	57
<b>Figura 11.</b> Correlación entre la diversidad genética y el porcentaje de hermanos completos en las poblaciones silvestres y viveros	57
<b>Figura 12.</b> Análisis de correspondencia múltiple; (A) Agrupaciones por alelos compartidos (B) Agrupaciones por poblaciones evaluadas Cocora, Roso, Milán, Jardín Botánico, Toche, La Línea	59
<b>Figura 13.</b> Gráfico de dispersión usando al nombre de la población como variable secundaria para mostrar la separación genética entre poblaciones	60
<b>Figura 14.</b> Cajas de frecuencias de los diferentes alelos de los 10 loci evaluados en los tres viveros y las tres poblaciones silvestres	61

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Detalles de las poblaciones evaluadas. Tres viveros y tres poblaciones silvestres de *Ceroxylon quindiuense* 42
- Tabla 2.** Longitud en pares de bases (pb) de alelos encontrados para cada locus (recuadro superior) y frecuencia alélica FA (recuadro inferior) 42
- Tabla 3.** Alelos con frecuencias superiores a 0,5 por cada locus en los tres viveros y en la población del Valle de Cocora: Jardín Botánico (JB), Milán (Mi), Roso (Ro), y Cocora (Co) 43
- Tabla 4.** Valores por locus analizados en cada población: Número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), contenido de información polimórfico, porcentaje de homocigosidad y heterocigosidad observados (X) promedio  
44
- Tabla 5.** Contenido de información polimórfico PIC por loci, amarillo valores superiores a 0,5; azul valores entre 0,5- 0,25; rojo valores inferiores a 0,25 47
- Tabla 6.** Índices de estructura genética; G<sub>st</sub> debajo de la diagonal y D<sub>est</sub> arriba de la diagonal 50

<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza molecular AMOVA en los 3 viveros y en las 3 poblaciones silvestres de <i>Ceroxylon quinduense</i>	50
--	----

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Tabla A1.</b> Cebadores usados para los análisis, secuencia y temperatura de hibridación de los 10 microsatélites	86
--	----

<b>Figura A1.</b> Gel de poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs5. Población Toche. Marcado de tamaño 25pb	87
---	----

87

<b>Figura A2.</b> Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca25. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb	87
--	----

<b>Figura A3.</b> Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs30. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb	87
--	----

<b>Figura A4.</b> Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca16. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb	87
--	----

<b>Figura A5.</b> Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs24. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb	88
---	----

**Figura A6.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca16. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb 88

**Figura A7.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs3. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb 88

**Figura A8.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs30. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb 88

**Figura A9.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs5. Vivero Jardín Botánico. Marcador de tamaño 25pb 89

**Figura A10.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs30. Vivero Jardín Botánico. Marcador de tamaño 25pb 89

**Figura A11.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca7. Vivero Roso. Marcador de tamaño 25pb 89

**Figura A12.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en los microsatélites Cs5, Ca20, Cs3 (izquierda a derecha). Población La Línea. Marcador de tamaño 25pb

89

**Figura A13.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca16. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb 89

**Figura A14.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca16. Vivero Jardín Botánico. Marcador de tamaño 10pb 90

**Figura A15.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Ca16. Población Toche. Marcador de tamaño 10pb 90

**Figura A16.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado en el microsatélite Cs5. Población Toche. Marcador de tamaño 10pb 90

## RESUMEN

La palma de cera *Ceroxylon quindiuense*, es el árbol Nacional de Colombia; su característica de especie clave dentro de los Andes Centrales la hacen una especie modelo ideal para la conservación. Por su importancia económica, ecológica, cultural y social, crece la necesidad de plantear estrategias de manejo óptimas que se enfoquen en la persistencia de la especie. En el Valle de Cocora la palma de cera del Quindío está en amenaza de desaparición, por lo que es necesario empezar con el repoblamiento de la zona. El objetivo principal del trabajo fue la caracterización genética de tres viveros de *C. quindiuense* del departamento del Quindío con diez marcadores moleculares microsatélites. Se evaluaron en total 57 individuos de tres viveros: Jardín, Calarcá (30 individuos); Milán, Salento (11 individuos) y Roso, Circasia (16 individuos). Se comparó la diversidad genética ( $H_e$ ) de la población del Valle de Cocora (31 individuos) con los tres viveros de *C. quindiuense*, la cual difirió un poco entre las colecciones (0.627) y la población silvestre (0.698). Se identificó un total de 136 alelos en los tres viveros y la población silvestre, de los cuales un alto porcentaje (25%) era de alelos privados de Cocora, aunque también se encontró un 10% de alelos privados por vivero. Se realizó un análisis de asignación multivariado, DAPC por sus siglas

en inglés, para determinar la estructura poblacional de viveros y poblaciones silvestres donde se incluyeron otras dos poblaciones silvestres Toche y La Línea del departamento de Tolima. Se detectó una alta estructuración entre los grupos evaluados silvestres y los viveros, sin embargo existió una gran similitud genética entre el Jardín, Milán y Cocora, resultados concordantes con los análisis de distancias genéticas y análisis de correspondencias múltiples (ACM). Se realizó un análisis de parentesco y se encontró que los viveros presentan mayor porcentaje de hermanos completos que las poblaciones silvestres, por lo cual hay un déficit de heterocigotos y sobrerrepresentación de ciertos genotipos respecto a otros. En conclusión, el Jardín y Milán tiene una alta similitud genética con Cocora, a diferencia de Roso que presentó grandes diferencias con todas las poblaciones silvestres. No se evidenció señal de mezcla entre los viveros y las poblaciones de Toche y La Línea. Los viveros evaluados no están capturando la diversidad genética total de las poblaciones silvestres, aunque la diversidad genética presentada por vivero no es muy baja ( $< 0.1$ ). Por lo anterior, a partir del tamaño y representatividad de la muestra evaluada en el presente estudio, los individuos de Jardín y Milán son aptos para la siembra en el Valle de Cocora ya que constituyen parte del acervo genético de la población silvestre.

**Palabras clave:** Genética de la conservación, palma de cera, microsatélites, restauración de poblaciones silvestres, estructura genética poblacional.

## **ABSTRACT**

The wax palm *Ceroxylon quindiuense* is the National Tree of Colombia; it is a characteristic key species within the Central Andes that make it an ideal model species for conservation. Further, given its economic, ecological, cultural, and social importance, best management strategies are in urgent demand. One of these strategies, is the promotion and establishment of genetically diverse live plant collections and nurseries to be used in breeding and restoration programs. The main objective was the genetic characterization of three nurseries of *C. quindiuense* in Quindío by genotyping ten microsatellite molecular markers. We

evaluated 57 individuals of three nurseries: Jardín, Calarcá (30 individuals); Milán, Salento (11 individuals) and Roso, Circasia (16 individuals). We compared the genetic diversity of Cocora (wild population) (31 individuals) with the three nurseries of *C. quindiuense*. Mean diversity ( $H_e$ ) differed little between collections (0.627) and the wild population (0.698). A total of 136 alleles were identified in nurseries and wild populations. High percentages (25%) of private alleles were found in Cocora, although some were found in the nurseries (10%). We performed a discriminant analysis of principal componentes (DAPC) to determine the population structure between nurseries and wild populations, in which case we included two wild populations, Toche and La Línea (Tolima). High structuring between the wild populations and the nurseries was detected. However, there is greater genetic similarity between Jardín, Milán (nurseries) and Cocora (wild). This results were concordant with the obtained genetic distances and ACM. We also performed an analysis of kinship and found that nurseries have a higher percentage of full siblings than wild populations. Nurseries had heterozygote deficiency and overrepresentation of certain genotypes over others. In conclusion, Jardín and Milán nurseries were more similar to wild populations than Roso. No admixture signal between nursery stocks and the wild populations of Toche and La Línea was evident. Nurseries evaluated are not capturing the total genetic diversity of wild populations, although genetic diversity by nursery is not low ( $< 0.1$ ). Individuals from Jardín and Milán are suitable for planting in Cocora given they make part of the gene pool of this wild population.

**Keywords:** Conservation genetics, wax palm, microsatellite markers, restoration of wild populations, genetic population structure.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Consideraciones generales y esquema de la tesis

La familia de las palmas se encuentra distribuida en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Son de un alto valor comercial y ecológico, exhibiendo



complejos patrones espaciales de distribución de especies y diversidad. El género *Ceroxylon* es endémico a las montañas andinas y es uno de los géneros más importantes de esa región. El género incluye 12 especies, distribuidas a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia. Su rango altitudinal está entre los 800 a 3.300 msnm, siendo a menudo árboles dominantes del dosel en bosques húmedos montanos y dada sus características ecológicas son consideradas especies clave dentro de los ecosistemas que habitan (Sanín y Galeano, 2011). *Ceroxylon* es uno de los cuatro géneros de palma que se encuentran en la tribu Ceroxyleae. Trénel *et al.*, (2007) realizaron estudios filogenéticos, basados en caracteres moleculares, de la subfamilia Ceroxyloideae, los resultados mostraron la hipótesis de dispersión a través de la Antártida en el Eoceno como una explicación a la disyunción de la tribu en la parte sur. De igual forma, Baker y Covreur, (2013) concuerdan en que la diversificación de las palmas del linaje de *Ceroxyloideae* se dio a finales del Cretácico- Cenozoico temprano.

Por otra parte, las relaciones específicas dentro del género *Ceroxylon* evaluadas por Sanín, (2013a). La colonización del Neógeno de la parte norte de los Andes seguido del levantamiento de la cordillera fue sugerida como la principal ruta de diversificación del género. Las adaptaciones evolutivas de *Ceroxylon* son específicas de condiciones climáticas principalmente de temperatura (elevación) y la diferenciación del nicho climático entre los clados anidados en la filogenia dio soporte al proceso altitudinal de segregación. Dentro del árbol evolutivo del género basado en caracteres moleculares, *Ceroxylon quindiuense* pertenece a una rama conformada por tres especies cercanamente emparentadas: *C. ceriferum*, de Venezuela y el norte de Colombia; *C. quindiuense*, de Venezuela y Colombia, con una población disyunta en el norte de Perú; y *C. ventricosum*, que crece en Ecuador y el sur de Colombia, justo en el área intermedia entre las poblaciones de *C. quindiuense* de Colombia y Perú. (Sanín, 2013b).

*C. quindiuense* es una especie emblemática de los andes colombianos, dado aspectos de su biología como su abundancia, y su función de especie sombrilla, ya que es la principal fuente de alimento de aves y mamíferos pequeños como

murciélagos (Sanín y Galeano, 2011). Su importancia económica radica en los diferentes usos que se le ha dado. Hasta hace pocos años, las hojas jóvenes se cortaban en grandes cantidades para su uso en el Domingo de Ramos durante la Semana Santa; la extracción de la cera que cubre los tallos se utilizaba para la fabricación de velas y fósforos, que eran vendidos en los mercados locales (Sanín, 2013b). Actualmente, en Antioquia y Tolima los tallos son un importante material de construcción, uso que es altamente destructivo, tratándose de una especie longeva de tallos solitarios. Los tallos se utilizan para hacer las columnas, los travesaños de los techos, como tejas o, rajados, para cubrir las paredes interiores o el piso en las casas, para hacer las cercas de las huertas y corrales, y como postes (Galeano *et al.*, 2008). Existen otros usos menores que son bastante variados, por ejemplo, los frutos sirven de alimento para las vacas y los cerdos y a menudo es usada como planta ornamental (Sanín, 2013b).

Por su declaración como Árbol Nacional de Colombia mediante la ley 61 de 1985 (Congreso de Colombia, 1985), la palma de cera del Quindío es un emblema nacional. Con el paso del tiempo, ha aumentado el interés del público general por conocer la palma y por visitar los sitios en los que ella crece. De igual forma es uno de los representantes característicos del Paisaje Cultural Cafetero afianzando aspectos económicos y culturales a la identidad de una región joven (UNESCO, 2011).

*C. quindiuense* se encuentra distribuida en las Cordilleras Oriental (Norte de Santander hasta Caquetá) y Central (Antioquia a Tolima), y más escasa en la Cordillera Occidental (Alrededores de los municipios de Jardín y Andes, Antioquia, y Riosucio, Caldas, y al oeste de Cali); también se encuentra en la parte Norte de Perú entre los 2000—2700m (Sanín y Galeano, 2011; Sanín *et al.*, 2013). Particularmente abundante en las dos vertientes de la Cordillera Central, sobre todo en la vertiente del Río Cauca y en bosques de niebla, entre los 2000 y 3100 m, donde a menudo llega a ser el elemento dominante en terrenos escarpados, ocasionalmente descendiendo hasta 1550 m en la Cuchilla del Ramo, al oeste de Zapatoca, Santander (Bernal, R. com. pers.). Son plantas dioicas cuyos ciclos de

vida superan los dos siglos y la proporción de sexos es de 1:1. La fase de establecimiento es prolongada (probablemente comparable con *C. alpinum*), donde se demora aproximadamente 57 años antes de empezar a producir tallo (Vergara-Chaparro, 2002). La floración es anual y tiene lugar entre marzo y abril y los frutos son consumidos por diferentes aves migratorias y semiendémicas (Galeano y Bernal, 2005), así como mamíferos de pequeño y gran porte (Sanín y Anthelme, *in press*; Henderson *et al.*, 1995).

Sanín *et al.*, (2013) estudiaron los patrones demográficos de la especie, evaluando la estructura ecológica y modelos de crecimiento. Se encontró que el cambio del paisaje y la intervención antropogénica en la población del Valle de Cocora han generado unos patrones de resiliencia que han permitido que *C. quindiuense* sobreviva a ecosistemas perturbados. De igual forma estudios en la estructura poblacional y diversidad genética de la especie muestran que las poblaciones están muy estructuradas, dado al aislamiento reproductivo y al poco flujo génico entre ellas. Además, que la mayor diversidad genética se concentra en las poblaciones de la Cordillera Central, Quindío y Tolima (Sanín *et al.*, *en prep*; Galeano *et al.*, 2015).

## **2. ESTADO DEL ARTE**

### **2.1 Estado de conservación de *Ceroxylon quindiuense***

A pesar de su importancia la palma de cera se encuentra dentro de la lista roja de especies amenazadas en la categoría en peligro de extinción EN (Borchsenius y Skov, 1999; Galeano y Bernal, 2005). Es ampliamente aceptado que la perturbación intensa como la deforestación y la fragmentación del hábitat, afectan el rendimiento y la abundancia de las especies de plantas en los bosques neotropicales (Debinski y Holt, 2000). En el caso de la región cafetera en Colombia, gran parte del hábitat natural de la palma se ha visto afectado por la conversión a potreros para el pastoreo, la ganadería, las plantaciones de café y otros cultivos. A pesar de esto, Palomino–Ortiz (1991) determinó que persiste una gran abundancia de palma de cera en numerosas poblaciones incluso en zonas

perturbadas, lo cual sugiere que la especie es resistente. Sin embargo, los efectos negativos de la intervención del hábitat natural son muy evidentes. Girón-Vanderhuck *et al.*, (2001) estudiaron la estructura de las poblaciones de *C. quindiuense* en los Andes Centrales de Colombia, la mayoría de los individuos fueron encontrados en las poblaciones altamente reducidas rodeadas por largas zonas de pasto o por terrenos erosionados donde no hay persistencia de palma. De igual forma, la destrucción de los bosques aledaños desaparece a los organismos con los que la palma tiene interacciones ecológicas, alterando el equilibrio del ecosistema (Madriñan y Schultes, 1995).

Los patrones demográficos encontrados por Sanín *et al.*, (2013) indican que las poblaciones de palma están tácitamente muertas debido a la ausencia de regeneración. Solo las rosetas que tienen meristemas subterráneos e individuos juveniles con tallos cortos podrían sobrevivir a la deforestación, la quema y los efectos de los grandes herbívoros, mientras que las plántulas y juveniles sin meristemas subterráneos son más susceptibles a las condiciones anteriores.

Por otro lado, aunque los adultos de claros de bosque puedan producir semillas viables, la probabilidad que esas semillas lleguen a estados maduros es baja, ya que, las condiciones de humedad y regímenes de luz de las zonas intervenidas cambian drásticamente (Moore y Anderson, 1976; Sanín, 2013b). Con el aumento de las zonas de potreros en las regiones adyacentes al hábitat de la palma, estas condiciones se amplifican, ya que, las plántulas en las zonas de clareo de bosque están más expuestas a ser comidas, en especial la herbívora por parte del ganado (Madriñan y Schultes, 1995; Anthelme *et al.*, 2011; Sanín *et al.*, 2013), lo que se refleja en las bajas tasas de supervivencia. Los adultos sobreviven en medio de estos potreros, pero la especie no logra regenerarse debido a que las plántulas no resisten la plena exposición ni el pastoreo (Anthelme *et al.*, 2011). Por esta razón, el número de individuos que crecen en los palmares se reduce año tras año, a medida que las palmas mueren sin dejar reemplazo (Bernal y Sanín, 2013)

La principal amenaza de la especie es la deforestación y la disminución de su hábitat natural, donde dado su largo periodo de crecimiento los juveniles no logran

acoplarse y sobrevivir a las condiciones adversas de los potreros. La extracción del ramo retarda el crecimiento de las rosetas lo que les genera la muerte por agotamiento. Otro factor de gran impacto es el daño mecánico por herbivoría por parte del ganado que se encuentra inmerso en la matriz del paisaje de palmas y otra amenaza para las poblaciones es la utilización del tallo como material de construcción, uso que es altamente dañino dado que se trata de una planta muy longeva y de tallo solitario (Sanín *et al.*, en prep; Sanín, 2013b). Esta situación genera que los adultos mueran sin poder dejar nuevas palmas que las remplacen, ocasionando una reducción de la población (Bernal y Sanín, 2013).

La situación actual del Valle de Cocora muestra un gran número de palmas inmersas en zonas de potreros, sin embargo los estudios realizados por Sanín *et al.*, (2013) muestran que la distribución actual de *C. quindiuense* en los pastizales se deben a una condición de resistencia de las rosetas de palma en los inicios de la deforestación en esta zona; en etapas tempranas los estadios de roseta son resistentes a condiciones adversas como la quema e inclusive la tala o herbivoría, Esto hizo posible la presencia de la población de los adultos actuales que se observan en el valle la cual tiene aproximadamente 74 años. Sin embargo, a pesar de que la gran mayoría de rosetas de palma se han convertido en adultos, aun bajo el impacto de la deforestación, la regeneración por semillas producidas por los actuales adultos no ha tomado lugar, ya que, esta clase no es resistente al pastoreo (Sanín *et al.*, 2013).

Esta situación conlleva a un cambio a nivel demográfico preocupante, dado que en primer lugar, la densidad de adultos en los pastos es menor a la de los bosques, y en segundo lugar la generación de adultos en los pastos no están dejando descendencia, dado a las condiciones adversas de la zona. A pesar de las características de resiliencia de la palmas juveniles y de la gran robustez y fortaleza que muestran las palmas en un estado adultos, no es suficiente para mantener la población bajo condiciones de cambio tan fuertes.

Aunque la cantidad de semillas que producen las palmas no son pocas y la cantidad que germinan tampoco lo son, la matriz en que están inmersas son un

gran inconveniente para su permanencia, por lo cual no ha habido un relevo poblacional en por lo menos los últimos 100 años, lo que deja el paisaje de Cocora con palmas adultas que mueren de viejas y sin individuos jóvenes que las remplacen (Sanín, 2013a).

La situación se agrava más dado que los potreros fueron abiertos hace muchos años, ventana de tiempo durante la cual, las palmas adultas no han podido reproducirse y se hace más preocupante cuando actualmente las zonas de potrero en Cocora van en aumento (Bernal y Sanín 2013).

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Efecto de la transformación del paisaje en la diversidad genética de las poblaciones**

La diversidad genética o las características genéticas son las causantes de determinar cómo se comporta la especie a cambios en el ambiente, es decir, la información codificada en su genoma es fundamental para determinar la adaptación a ambientes cambiantes como lo son las partes tropicales, en especial la zona Andina (Ruber *et al.*, 2001). Por lo cual, se entiende que a mayor diversidad genética, las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente, por lo que las especies con poca diversidad genética tienen mayor riesgo frente a esos cambios Jiménez y Collada, 2008).

El desarrollo de la civilización humana ha resultado en la transformación de vastas áreas naturales en paisajes antropogénicos, que conlleva a procesos de fragmentación, deforestación, entre otros, los cuales alteran la estructura, distribución y funcionalidad de los ecosistemas naturales (Saunders *et al.*, 1991; Young *et al.*, 1996; Courchamp y Gascoigne, 2003; Leimu *et al.*, 2006; Whittaker y Fernández, 2007). Estos aspectos no solo tiene impactos a nivel ecológico y demográfico sobre las poblaciones de palma, sino también afecta a nivel genético.

Aunque pocos estudios han abordado el impacto sobre la diversidad genética del género; Gaitán (2003) realiza aproximaciones en cuanto a la estructura poblacional y diversidad genética en tres especies de palma (*Ceroxylon sasaima*, *C. alpinum* y *Attalea amigdalina*) inmersas en un paisaje fragmentado en los Andes centrales de Colombia. Las evaluaciones de la diversidad genética utilizando marcadores moleculares microsatélites en *C. sasaima* y *C. alpinum* mostraron que las poblaciones estudiadas conservaban una alta diversidad genética a pesar de su distribución restringida, pérdida de hábitat y bajo número de individuos que sobreviven. Adicionalmente no se encontraron diferencias en la diversidad genética entre las plántulas, juveniles y adultos en ninguna de las especies del género *Ceroxylon* estudiadas, pero la autora sugiere que esto puede cambiar si se modelara el efecto a un plazo más largo dada la longevidad de la palma. La baja diferenciación genética encontrada en las áreas muestreadas de *C. alpinum* indicaron que todas hacían parte de una misma población o unidad evolutiva.

Sin embargo, consecuencias de lo anterior es la reducción del tamaño de la población y un incremento del aislamiento de las poblaciones que quedan inmersas en matrices antropogénicas (McGarigal y Cushman, 2002; Fahrig, 2003). Esto tiene no solo efectos a nivel biológico, sino también a nivel genético, ya que, se crean barreras que impiden la conexión entre poblaciones y por ende el flujo génico entre las mismas. El efecto más inmediato de la fragmentación y la deforestación en la composición genética depende de dos factores: el tamaño efectivo poblacional dentro de los fragmentos y los patrones de variabilidad genética de la población antes de los cambios (Nason et al., 1997; Hamrick, 2004). En el caso de *C. quindiuense* ya se ha mencionado como se ha visto alterada la estructura demográfica, como en el caso de la población de Cocora, las discontinuidades en el hábitat implican que puede aumentar la endogamia y que el acervo génico de la población se verá reducido, ya que no hay un intercambio o flujo génico con otras poblaciones.

Existe un gran aislamiento entre las grandes poblaciones actuales del complejo de *C. quindiuense* según los estudios de Sanín *et al.*, (en prep.) quienes utilizando datos de microsatélites exploraron aspectos filogeográficos y de conservación de esta especie. Muy probablemente las restricciones de distribución históricas y los recientes efectos antropogénicos sean la causa de los altos niveles de estructuración poblacional. Por ejemplo los efectos de cuello de botella en adultos y el aislamiento poblacional consecuencia del cambio del hábitat de bosque a potrero (Sanín *et al.*, en prep).

La alta deficiencia de heterocigotos encontrada en las poblaciones, entre ellas la población del Valle de Cocora, también se atribuyen a la endogamia, producto del aislamiento de las poblaciones y la reducción del hábitat. Los valores de heterocigosidad son más altos en los adultos que en los semilleros, a esto se le suma un número efectivo poblacional pequeño, lo que soporta la idea de un cuello de botella post-colonización; estos escenarios en los que se sitúan las poblaciones de *C. quindiuense* indican que éstas están fuera de los límites seguros de conservación (Sanín *et al.*, en prep).

### **3.2 Programa de repoblamiento de poblaciones silvestres**

La importancia que tiene Cocora en cuanto al programa de recuperación de la palma de cera del Quindío está dada por aspectos ecológicos, por ejemplo su importancia como especie paraguas y especie clave para el sostenimiento de los ecosistemas altoandinos (Galeano *et al.*, 2015). De igual forma, Cocora y sus palmas son de gran importancia social, económica y cultural. Sin embargo, los palmares de Cocora se encuentran en peligro de desaparecer por la acelerada disminución de la población dada la alta mortalidad de las palmas durante sus primeras fases de desarrollo y de la edad avanzada de los individuos que se conservan en los potreros (Bernal y Sanín, 2013).

Como se mencionó anteriormente, la diversidad genética es una herramienta que permite a las poblaciones acoplarse a los cambios en su entorno (Ruber *et al.*, 2001), por lo cual en los programas de conservación es fundamental plantear



estrategias que involucren la conservación la diversidad genética de las poblaciones. Respecto a las poblaciones de *Ceroxylon quinduense*, la mayor diversidad genética se encontró en la Cordillera Central en Tolima y Quindío, a pesar de la pérdida actual de hábitat (Sanín, 2013a). Por lo cual, los programas de repoblamiento para el mantenimiento de la diversidad genética son de gran importancia, en caso de una eventualidad que cause extinciones locales en las poblaciones satélites, como los eventos cuello de botella o endogamia debido al bajo número efectivo de la población (Galeano *et al.*, 2015).

El alto del Valle de Cocora está en el corazón de lo que se ha definido como la ecorregión eje cafetero, la cual se extiende a lo largo de la Cordillera Central desde el norte de departamento del Valle del Cauca hasta el páramo de Sonsón, en Antioquia. Esta zona conforma el contexto inmediato del Parque Nacional Natural Los Nevados (Carder,2002). En este último se reconoce a Cocora como “acto indispensable de alta prioridad” para su plan de manejo (Loterio-Echeverri *et al.*, 2006; Bernal y Sanín, 2013) teniendo como objetivo específico proteger a perpetuidad sitios representativos del hábitat natural de la palma de cera (*Ceroxylon alpinum*, y *C. quinduense*) (Loterio-Echeverri *et al.*, 2006).

Además de todos los usos que se le dan a la palma, Cocora tiene un gran atractivo turístico gracias a la categoría de la palma de cera más alta del mundo y que es el árbol nacional de Colombia, por lo cual acoge a miles de turistas diariamente en las laderas del Valle. Más recientemente el renombre que se le ha dado a esta zona debido a la declaración del Paisaje Cultural Cafetero (PCC) como patrimonio de la humanidad (UNESCO, 2011) y en el cual lleva como parte de su emblema la palma de cera, lo que le da un gran significado a la importancia de esta en los paisajes del PCC. Aprovechando lo anterior y que es Cocora el corazón de la región cafetera, es ideal pensar en el Santuario Nacional de Palma de Cera y en el programa piloto de repoblamiento que contribuya a establecer corredores que conecten los bosques remanentes en la matriz de potreros, incrementando las áreas de bosques y el número de palmas (Bernal y Sanín, 2013). La estrategia más importante es el repoblamiento de zonas donde la palma

naturalmente crece, por lo tanto el material ideal para repoblación sería el de los viveros los cuales están formados por individuos provenientes de esta zona.

### **3.3 Reintroducción de individuos para la repoblación de hábitats naturales**

Las especies silvestres están bajo creciente amenaza, principalmente dado a los cambios antropogénicos del ambiente (Ricketts *et al.*, 2005; Thuiller, 2007). Por lo anterior se han propuesto estrategias de conservación *in situ*. El mejor lugar para conservar la diversidad de plantas en las áreas silvestres, donde un gran número de especies presentan poblaciones viables que pueden persistir en sus hábitats naturales con sus interacciones ecológicas asociadas (McNaughton, 1989; Godefroid, *et al.*, 2011). Sin embargo, los hábitats degradados y alterados han tomado mayor proporción en los paisajes naturales (Vitt y Havens, 2004), lo que lleva al incremento en las tasas de extinción de las plantas en estos hábitats (Havens *et al.*, 2006).

La restauración del hábitat es una buena aproximación en la conservación que permite a muchas poblaciones de plantas recuperarse sin la necesidad de introducir propágulos (semillas o trasplantes) (Menges, 2008). Sin embargo, dada la reducción del hábitat difícilmente las poblaciones puedan restaurarse de manera espontánea y las plantas raras o endémicas en los sitios restaurados tenderán a desaparecer en el tiempo (Thompson *et al.*, 1997; Godefroid, *et al.*, 2011). En este caso la reintroducción de especies nativas se ha convertido en una herramienta importante en la conservación de la flora silvestre para propósitos de restauración y recuperación de especies raras o endémicas (Godefroid *et al.*, 2011).

El término reintroducciones se utilizó bajo lo definido por la UICN como la incorporación de un organismo a su hábitat natural/histórico la cual a su vez ha ido desapareciendo (UICN, 1987). El propósito biológico de la reintroducciones es establecer o aumentar las poblaciones existentes con el fin de incrementar las perspectivas de supervivencia de las especies (Pavlik, 1996; Van-Groenendael *et al.*, 1998; Luijten *et al.*, 2002). Aunque las reintroducciones están bien definidas por la UICN, las implicaciones genéticas no son del todo claras. Weeks *et al.*,

(2011) introducen el término captura genética en cuanto a las reintroducciones. Es decir, se trabajan reintroducciones genéticas las cuales tienen como objetivo incrementar/mantener la variación genética.

Una alta diversidad genética permite que las especies puedan soportar un ambiente poco predecible y heterogéneo (Sanchez y Retuerto, 2007) y puede permitir una adaptación a condiciones locales o cambiantes (Mckay *et al.*, 2005). No obstante, la diversidad genética del material vegetal usado para procesos de restauración es en muchas ocasiones limitada, ya que las semillas se recolectan de una reducida población de progenitores (González *et al.*, 2013). Por lo tanto, desde la parte aplicada, es vital mantener una alta diversidad genética (e.g recolección de plántulas o semillas provenientes de distintos progenitores) para los procesos de restauración (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2010).

Pese a lo anterior, es importante tener en cuenta que las reintroducciones mal encaminadas pueden desenvolver efectos fundadores inadvertidos que pueden resultar en cuellos de botella severos (Hufford y Mazer, 2003). Lo anterior es particularmente relevante si las poblaciones donantes que serán introducidas están bajo condiciones de cuello de botella, dado porque solo se muestrearon porciones de la población original, o porque solo algunas pocas plantas están contribuyendo para formar las poblaciones donantes (Robichaux *et al.*, 1997; Krauss *et al.*, 2002). La situación ideal es cuando la población a introducir contiene (y retiene) niveles de variación genética similar a la población silvestre (Mengues, 2008).

Los genotipos no locales tienden a no adaptarse bien a las condiciones ambientales locales lo que puede resultar en un bajo fitness. Para las plantas de largos ciclos de vida como *Ceroxylon* los problemas de la reintroducción solo pueden evidenciarse años después del establecimiento de los individuos introducidos (Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2010). Por lo cual, la hibridación intraespecífica en procesos de repoblamiento, es decir la mezcla entre genotipos locales e introducidos, puede resultar en depresión exogámica, i.e. reducido fitness en las generaciones siguientes ya que no hay genotipos adaptados a el

ambiente local (Hufford y Mazer, 2003; Edmands, 2007; Vander Mijnsbrugge *et al.*, 2010). Dado lo anterior, es de vital importancia que los individuos que serán introducidos a las poblaciones silvestres para los procesos de repoblamiento provengan de las mismas poblaciones, ya que el uso de individuos foráneos para las prácticas de repoblamiento pueden alterar la diversidad genética y la estructura poblacional de la población silvestre (Aavik *et al.*, 2012).

En el escenario crítico en el que se encuentra la población del Valle de Cocora, ya que es de las más pequeñas en el país (Bernal y Sanín, 2013; Galeano *et al.*, 2015.), es necesario que el programa de repoblamiento involucre a su vez la creación de viveros donde se germinen las semillas producidas por los adultos del valle, el cuidado de las plántulas hasta que alcancen una edad de siembra con alta probabilidad de supervivencia en las condiciones de potrero, la siembra de las palmas jóvenes en los sitios que se protegerán del valle y la protección de las palmas en el valle a largo plazo (Sanín *et al.*, 2013; Galeano *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de las condiciones de Cocora, el objetivo con el programa de repoblamiento es mantener el acervo genético de la población silvestre, ya que, es una de las poblaciones con mayor diversidad genética (Sanín, 2013a), por lo cual no se pretende alterar el acervo genético que ya está adaptado a las condiciones del ambiente del Valle de Cocora.

### **3.4 Regeneración de los bosques naturales de palma de cera**

La regeneración es mucho más factible y rápida en poblaciones *ex situ* (como viveros) que en poblaciones silvestres, en especial para especies que afrontan pérdida de hábitat y difícil establecimiento en el ecosistema por factores antrópicos (Miao *et al.*, 2015). Cocora es una población que sobrevive en potreros y que está compuesta exclusivamente de adultos debido a la falta de regeneración de los palmares (Bernal y Sanín, 2013). Tratándose de una especie que demora 12 años en alcanzar un tamaño que le permita sobrevivir a condiciones de estrés, que puede tardar hasta 57 años para empezar a producir tallo y 83 años para empezar a reproducirse (Vergara-Chaparro, 2002; Sanín *et al.*, 2013), es de gran relevancia la articulación de viveros para mantener a los juveniles en las etapas más frágiles

del ciclo de vida, para su posterior introducción a los hábitats naturales. Existen casos de restauración de poblaciones de plantas silvestres utilizando individuos provenientes de viveros no oficiales (Piry *et al.*, 1999; Yokogawa *et al.*, 2013). En función de las necesidades de conservación, cada vez es más frecuente que los técnicos e investigadores de los centros de conservación *ex situ* participen activamente en el diseño, desarrollo y ejecución de programas de conservación *in situ*, destinados a que todas las acciones de conservación permitan la preservación de plantas silvestres en sus biotopos y hábitats naturales (Fahrig, 2003).

Por lo cual, los viveros actuales del departamento, en especial el del Jardín Botánico del Quindío (Jardín, de ahora en adelante), pueden apoyar la primera fase de establecimiento de los individuos juveniles, ya que actualmente cuenta con aproximadamente 60 palmas entre los 10 y 12 años de edad que están entre 2 y 3 metros de altura (juveniles). Estos individuos tienen mayor probabilidad de sobrevivir dado la baja mortalidad que se presenta en esta edad (Sanín *et al.*, 2013), lo que hace una etapa ideal para la reintroducción a las poblaciones silvestres y continuar con las estrategias de conservación a nivel *in situ*.

La iniciativa de repoblar los paisajes del Cocora debe ser manejada con cautela, ya que, sin los estudios adecuados se puede ver afectado el acervo genético de la población. Aun así, las estrategias de manejo sin los estudios pertinentes ni la planeación adecuada pueden llevar a la población a deriva génica después de la introducción de los individuos provenientes de las poblaciones *ex situ* (El-Lakany, 2004; Asmussen-Lange *et al.*, 2011; Yokogawa *et al.*, 2013). Varios estudios demuestran que las estrategias no planificadas de colección de semillas para la formación de viveros y su posterior reintroducción a las poblaciones silvestres pueden causar pérdida alélica y eventos de cuellos de botella (Dolan *et al.*, 2008). Para que esto no ocurra se debe tener claridad en cuanto a las características genéticas de los individuos que se van a introducir para no afectar el acervo génico de la población.

### **3.5 Importancia del uso de marcadores moleculares microsatélites**

Un marcador molecular es una secuencia de ADN que es fácilmente detectable y cuya herencia puede ser monitoreada, representan diferencias genéticas entre individuos o especies y revelan sitios de variación en el ADN. Los usos de los marcadores moleculares están basados en la ocurrencia natural de polimorfismos en el ADN, el cual se define como la ocurrencia simultánea de un carácter en la misma población de dos variantes discontinuas o genotipos (Jones *et al.*, 1997; Collard *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2009). Los microsatélites (SSR por sus siglas en inglés) son generados por diferentes tipos de mutaciones en el ADN así como mutaciones por sustitución (puntuales), reordenamientos (inserciones o deleciones) o errores en la replicación del ADN en tándem (Connell, 1998). A high through-put procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(4), 341-349.) y se han usado en muchos estudios de diversidad y relación genética en varias especies de plantas (Struss y Plieske, 1998; Udupa *et al.*, 1999; Abe *et al.*, 2003; Aranguren-Méndez *et al.*, 2005; Azofeifa-Delgado, 2006; Flórez *et al.*, 2008).

Dentro de sus ventajas se encuentra su alto contenido de información polimórfica, ya que, la naturaleza hipervariable de los microsatélites produce gran cantidad de variaciones alélicas aún entre grupos, variedades o poblaciones muy relacionadas (Powell *et al.*, 1996). Además son de herencia codominante y naturaleza multialélica, (Powell *et al.*, 1996) y están distribuidos de manera aleatoria en el genoma (Morgante *et al.*, 2002). A medida que más secuencias genómicas están siendo identificadas en varias especies eucariotas, se vuelve más evidente que los SSR son realmente abundantes en la mayoría de las especies y que están bien distribuidos a lo largo de sus genomas (Tóth *et al.*, 2000; Varshney *et al.*, 2005).

Dado lo anterior, también es importante resaltar el uso de microsatélites como herramientas moleculares en trabajos de conservación (e.g. Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Especialmente los datos de marcadores moleculares microsatélites han sido utilizados en la mayoría de estudios sobre genética del paisaje y genética de poblaciones (Storfer *et al.*, 2007; 2010), ya que permite estimar los niveles de

variabilidad genética dentro de las poblaciones y analizar las relaciones genéticas existentes entre las mismas (Aranguren-Méndez *et al.*, 2005). Además de mapeo genético y físico de genomas, para la identificación y discriminación de genotipos (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Alam y Islam, 2005).

Los loci microsatélites permiten una excelente resolución de procesos recientes, además de ser una poderosa herramienta para estudios genéticos por su elevado grado de polimorfismo, su herencia mendeliana simple y su característica codominante, la fácil medición y análisis, además de la confiabilidad del 100% (Goldstein y Schlotterer, 1999). Los microsatélites permiten hacer análisis de asignación de un individuo a un probable grupo de origen, lo que permite analizar estructuras intrapoblacionales (Roques *et al.*, 1999; Beheregaray y Sunnucks, 2001; Knutsen *et al.*, 2003) análisis de parentesco y análisis de paternidad (Marshall *et al.*, 1998; Worthington *et al.*, 1999), y los análisis de estructura poblacional (Herbers y Mouser, 1998; Toth *et al.*, 2000; Steneck *et al.*, 2002; Simko, 2009).

Los microsatélites pueden ser útiles en estudios que soporten el diseño de estrategias de conservación, como los análisis de diversidad genética y estructura poblacional para el diseño de colecciones *ex situ* (i.e viveros) (Li-Q *et al.*, 2005; Musoli *et al.*, 2006; Etishamul-haq *et al.*, 2001;), Los marcadores se pueden utilizar también en la identificación molecular de la huella genética para fines de identificación clonal (Pérez De La Torre *et al.*, 2005). Diversos estudios se han realizado utilizando SSR en el género *Ceroxylon* como se mencionó anteriormente, dada su versatilidad se ha podido evaluar la estructura y diversidad genética de varias especies del género.

Por todo lo anterior, para iniciar el programa de repoblamiento es importante corroborar la procedencia de los individuos que se van a ingresar a la población silvestre del Valle de Cocora, sin embargo, en esta especie es imposible reconocer la procedencia por características morfológicas, especialmente en las etapas juveniles. Por este motivo, Sanín *et al.*, (2013) realizó pruebas genéticas

preliminares con microsatélites nucleares en las cuales se estableció que algunas de las palmas del Jardín provienen de la Cordillera Central. Sin embargo, es indispensable evaluar más individuos del Jardín para probar su concordancia genética con los individuos de la población del Valle de Cocora que fueron evaluados por ella en los últimos años (Sanín *et al.*, en prep.).

Al estudio se vinculan otros dos viveros, para poder obtener más material para el repoblamiento. En este caso se evaluó también el vivero Milán el cual se encuentra en la parte baja del Valle de Cocora y el vivero Roso, el cual se encuentra en el municipio de Circasia. En vista de que se cuenta con un análisis preliminar de las plantas del Jardín, que indica que potencialmente las plantas provienen de la Cordillera Central. Se incorporaron otras dos poblaciones silvestres, Toche y La Línea, las cuales se encuentran de igual manera en la Cordillera Central en el departamento del Tolima, para evaluar potenciales señales de mezcla entre los viveros y las poblaciones silvestres. Es importante aclarar que el programa de repoblamiento está planeado exclusivamente para el Valle de Cocora, por lo cual, se espera que los individuos de los viveros tengan concordancia genética con esta población para poder reintroducirlos a esta zona.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Caracterizar genéticamente y evaluar la concordancia genética de los tres viveros de *Ceroxylon quindiuense* con la población del Valle de Cocora, para determinar si son aptos para aumentar la población local y Cuantificar la diversidad genética de los viveros seleccionados para evaluar la eficiencia en cuanto al rescate de la diversidad genética de las poblaciones silvestres.

### **4.2 Objetivos específicos**



1. Evaluar la diversidad genética presente en los viveros de Roso, Milán y Jardín.
2. Explorar la concordancia genética de los individuos de los viveros de Milán, Roso y el Jardín con la población silvestre del Valle de Cocora.
3. Comparar la diversidad genética y estructura poblacional de los tres viveros evaluados con la de las poblaciones silvestres del Valle de Cocora en Quindío y Toche y La Línea en Tolima.
4. Identificar los potenciales individuos de los viveros para iniciar el programa de repoblamiento en el Valle de Cocora.

## **5. Materiales y Métodos**

### **5.1 Poblaciones analizadas**

#### **5.1.1 Valle de Cocora (Quindío)**

Esta zona está situada en la vertiente occidental de la Cordillera Central, en la cuenca alta del río Quindío, en el municipio de Salento, a los 4° 38' 15" N, 75° 29' 18" O, entre 2300 y 2900 m de elevación. La zona con mayor cantidad de palmas está en las cuencas de las quebradas Cárdenas y San José, desde el punto en que estas confluyen para formar el río Quindío. Es un área de unas 600 hectáreas (ha), de las cuales unas 360 ha corresponden a potreros; el resto está formado por pequeños fragmentos de bosque o áreas de bosque mayores hacia las partes altas de las montañas, en diverso estado de conservación. El número de palmas que crecen en los potreros y en los bosques es aproximadamente el mismo, cerca de 1000 individuos. Esta área es la más famosa a nivel mundial como lugar para conocer los palmares de *Ceroxylon quindiuense*, y se ha convertido en un foco de

actividades turísticas que aumenta cada año. (Bernal y Sanín, 2013; Galeano *et al.*, 2015).

### **5.1.2 Toche- La Ceja, Tolima**

Esta región alberga las poblaciones más grandes de *Ceroxylon quindiuense* en Colombia. Se encuentra en la vertiente oriental de la Cordillera Central, cerca del corregimiento de Toche, vereda La Ceja en jurisdicción de los municipios de Ibagué y Cajamarca, 4° 30' 45" - 4° 31' 34" N y 75° 30' 29"- 75° 26' 31" O, entre 2160 y 3000 m de altitud, en la cuenca del río Toche. Esta área tiene una extensión de 4500 ha y comprende un mosaico de relictos de bosque con palma que presentan diversos grados de intervención, de hasta 40 ha, en una matriz de potreros en los que también sobreviven palmas. En los fragmentos de bosque se encuentran, en general, palmas en todos los estados de desarrollo, aunque en algunas áreas que bordean el potrero o en los fragmentos más pequeños hay muy pocas plántulas y juveniles, debido al ingreso del ganado. En los potreros solo se encuentran palmas adultas, que florecen y fructifican de manera regular pero no dejan descendencia allí, pues las plántulas no sobreviven a la plena exposición y al pastoreo (Galeano *et al.*, 2015).

### **5.1.3 La Línea**

Estos palmares se encuentran sobre la Cordillera Central de Colombia, en la parte occidental de Cajamarca, Tolima, en el paso de La Línea 75°35'37.77"W; 4°30'47.55"N; a una altitud entre los 2500 y los 2700 metros. Esta zona también muestra patrones de perturbación y deforestación parcial, inmersa en una matriz de potreros, pero rodeada aun por zonas de bosque. La deforestación en Línea fue total, sin embargo en los últimos 45 años las palmas han resistido la deforestación y se han convertido en adultos por medio de mecanismos de resiliencia por roseta, las cuales han sobrevivido y hoy forman las palmas adultas. Sin embargo, la matriz en la que están inmersas no permite que la regeneración se dé a cabo (Sanín *et a.*, 2013).

## **5.2 Viveros analizados**

### **5.2.1 Vivero Jardín Botánico del Quindío**

El Jardín Botánico del Quindío ha empezado con programas de recopilación y mantenimiento de las especies de palmas de Colombia, con el fin de aportar a los proyectos de conservación y educación ambiental. Actualmente el Jardín Botánico cuenta con 180 palmas de cera del Quindío, entre dos y tres metros de altura y cerca de doce años de edad, las cuales se encuentran en un estado de desarrollo resistente a las condiciones adversas del ambiente, ya que presentan una baja mortalidad y pueden ser reintroducidas fácilmente en la zona de Cocora (Sanín *et al.* 2013).

### **5.2.2 Vivero Milán, Salento, Quindío**

Este vivero está situado en la entrada al Valle de Cocora, y es reconocido por la labor que se realiza para la preservación de la palma de cera. Los individuos que se encuentran allí son plántulas aproximadamente de 0.5m extraídas de las zonas de potrero de las laderas de Cocora para evitar que sean comidas por el ganado. Se cuenta con un aproximadamente 20 plántulas de *C. quindiuense*.

### **5.2.3 Vivero Roso, Circasia, Quindío**

Este vivero está situado en las afueras del Municipio de Circasia y al igual que el anterior, también es reconocido por el trabajo de conservación de palmas a cargo de su propietario por más de 10 años. Las palmas *C. quindiuense* que allí se encuentran son producto de semillas decomisadas por la Corporación autónoma Regional del Quindío. Hay un total de 16 individuos con aproximadamente 12 años de edad, y entre los 4 y 5 metros de altura. Las condiciones de germinación son manejadas por el propietario.

### **5.3 Selección del material vegetal**

Se recolectó material de una pina de la hoja joven de las plantas de tres viveros provenientes del Jardín Botánico del Quindío-Calarcá (30 individuos), Roso-Circasia (16 individuos), Milán-Salento (11 individuos). Igualmente se colectó material de dos poblaciones silvestres del departamento del Tolima, Toche, hacienda Las Cruces y vereda La Ceja (26 individuos), La Línea, vereda Pedregales y hacienda La Cabañita (29 individuos). Para la población del Valle de Cocora se trabajó con los datos evaluados previamente por Sanín (2013a) (30 individuos).

El material vegetal se almacenó en sobres de papel inmersos en bolsas herméticas Sellopack llenas de silica gel, para acelerar la deshidratación de los tejidos previo a la extracción de ADN. Los análisis moleculares se desarrollaron en el laboratorio de genética molecular y cultivo de tejidos de la unidad de biotecnología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

### **5.4 Análisis de marcadores moleculares microsatélites**

#### **5.4.1 Extracción de ADN**

Se utilizó aproximadamente 1gr de tejido de la hoja, el ADN fue extraído utilizando el kit Qiagen DNeasy Plant Mini (Qiagen,Ltd.) Siguiendo las instrucciones de manufactura. La visualización del ADN se realizó con una mezcla de 5µl ADN, 4ul de Blue Juice y 7 de agua en geles de agarosa al 1,5% teñidos con el colorante Sybr® Safe de Invitrogen. Las concentraciones fueron estandarizadas utilizando NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3. Para la mayoría de las muestras se obtuvieron ADN de buena calidad y altas concentraciones. Las diluciones se realizaron a una concentración de 5ng/ul en 50ul y fueron almacenados a -20°C.

#### **5.4.2 Selección y evaluación de marcadores microsatélites**

Se evaluaron diez loci microsatélites descritos originalmente por Gaitán (2003) para *Ceroxylon alpinum* y *C. sasaimae*, y posteriormente transferidos a *C. quindiuense* Sanín *et al.*, (in prep.) (Tabla S1).

### **5.4.3 Amplificación de los marcadores microsatélites**

Para cada reacción de amplificación por PCR se usaron 25µl de volumen final, consistente en: 5µl de ADN (5ng/µl), 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix de Promega Ltd, 1 µl de cebador L-R y 5,5 µl de agua libre de nucleasas de Promega Ltd. El ADN y el GoTaq® Green Master Mix se mantuvieron siempre en hielo cuando estaban fuera del refrigerador para evitar la degradación a temperatura ambiente. Las amplificaciones se llevaron a cabo en los termocicladores PTC-100TM usando el siguiente programa: 94°C (4 min), [94°C (15 s), temperatura de anillamiento °C (15 s), 72°C (5 min)] por 35 ciclos, 72°C (5 min), 10°C (∞). La visualización se realizó en geles de agarosa al 3% (5ul mix pcr + 2µl agua) y posteriormente se probaron en geles de poliacrilamida 4% (29:1 acrilamida:bisacrilamida, 5M úrea y TBE 10X); el producto de pcr se diluyo en agua (1:1) para obtener una mejor calidad de visualización de las bandas dado que las muestras se trabajaron con la Gotaq®. Se corrió en el gel con el buffer de cargar 2X compuesto de formamida desionizada 95%, EDTA 0,5M (pH 8.0)g azul de bromofenol 0,03% y Xilencianol 0,05%; las muestras se desnaturaron a 95°C durante 2 minutos antes de servirse en el gel. Para mejor separación de los alelos, se dejaron calentar las cámaras de electroforesis Thermo Scientific OWL S3S a 55°C, para determinar el tamaño de los alelos se utilizó el marcador 10bp DNA ladder de Invitrogen. La lectura de las bandas fue realizada de manera independiente por dos investigadores para disminuir el sesgo de lectura.

### **5.5 Análisis de datos**

Para evaluar la diversidad genética y las categorías asociadas a la diversidad (número de alelos, número efectivo de alelos, contenido de información polimórfico (PIC), heterocigosidad esperada y observada, frecuencias alélicas) entre viveros y la población silvestre del Valle de Cocora, dado que en principio es la población referencia para evaluar concordancia genética para el programa de repoblamiento.

El análisis de las distancias genéticas, de la estructura poblacional, y los análisis multivariados se utilizaron para evaluar la concordancia genética entre los viveros y la población silvestre de Cocora. La inclusión de las otras dos poblaciones silvestres (Toche y La Línea) se realizó como control genético para evaluar potenciales señales de mezcla de los viveros en caso que existieran con estas poblaciones.

### **5.5.1 Diversidad genética de la población del Valle de Cocora y los viveros**

Estimaciones de diversidad molecular, equilibrio Hardy-Weinberg (EHW), deficiencia de heterocigotos ( $H_{def}$ ) y el test de desequilibrio de ligamiento fueron hechos en GENEPOPv 4.2 (Raymond y Rousset, 1995; Rousset, 2008), el cual emplea un método de cadenas markovianas, con 5000 iteraciones siguiendo el algoritmo de Guo y Thompson (1992). Los índices de diversidad molecular estándar fueron estimados en ARLEQUIN v 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 2005) incluyendo el número de alelos, el rango alélico y la heterocigosidad observada y esperada,  $H_o$  y  $H_e$  respectivamente. Se calculó el contenido de información polimórfico según Botstein *et al.*, (1980), usando la plataforma en línea de Nagy *et al.*, (2012). También se calcularon las frecuencias de alelos y número de alelos privados (presentes solo en un grupo) por población y por locus en el software GenAEx v.6.41 (Peakall y Smouse, 2006).

### **5.5.2 Estructura genética poblacional y análisis de cercanía entre poblaciones e individuos**

La divergencia genética entre poblaciones se estimó calculando la aproximación clásica del  $F_{ST}$  (Weir y Cockerham, 1984) y la modificación de Nei para alelos múltiples  $G_{st}$  (Nei, 1973). Aunque el  $F_{ST}$  ha sido usado ampliamente como una medida de estructura poblacional, ha sido criticado recientemente debido a su dependencia de la heterocigosidad intrapoblacional (Jost, 2009; Meirmans y Hedrick, 2011). Por lo tanto, la diferenciación poblacional se estimó también usando el estadístico  $Dest$ , el cual refleja de manera más precisa la diferenciación

genética entre poblaciones debido a que incluye una partición multiplicativa de la diversidad, basado más en el número de alelos que en la heterocigosidad esperada (Jost, 2008). El  $F_{st}$  se calculó en GENEPOPv 4.2 y para el cálculo del  $D_{est}$  y el  $G_{st}$  se utilizó el paquete DEMETics de R (Gerlach *et al.*, 2010), con un método de bootstrap de 1000 repeticiones para estimar el nivel de significancia (Manly, 2006).

Para analizar la relación genética entre viveros y las poblaciones silvestres, se realizaron dos tipos de análisis de agrupamiento. Primero se realizó un Análisis Discriminante de Componentes principales (DAPC) en la librería Adegenet v.1.4-2 del software R, conservando 10 componentes principales y 3 funciones discriminantes. El DAPC es un análisis multivariante que permite identificar y describir grupos de individuos genéticamente relacionados (Jombart *et al.*, 2010). En primera instancia los datos se transforman a componentes no correlacionados, reteniendo la mayoría de información genética a través del Análisis de Componentes Principales (PCA), posteriormente estos componentes se someten a un Análisis Discriminante (DA), el cual minimiza la varianza genética dentro de las poblaciones mientras que maximiza la variación entre poblaciones, aportando mayor resolución a los grupos genéticos predefinidos en el PCA. Este método es igual de sensible a los programas basados en agrupamientos bayesianos, con la ventaja que no asume EHW o desequilibrio de ligamiento (Jombart *et al.*, 2010).

Este método es muy versátil dado que se ha encontrado que la mayoría de las poblaciones de *Ceroxylon* se desvían del equilibrio (Sanín, 2013a). En segundo lugar, se calcularon las distancias genéticas para las poblaciones y viveros evaluados usando la distancia propuesta por Nei, (1972), el cual se basa en la identidad de los genes entre las poblaciones. Se utilizó la función *dist.genpop* en la librería Adegenet 1.4-2. Para observar cercanía genética entre todos los individuos de los 6 grupos analizados se calcularon distancias genéticas basada en la aproximación propuesta por Kosman y Leonard, (2005), para alelos codominantes con la librería mmod v1.2.1. Posteriormente para la visualización de las matrices

resultante se realizaron análisis de conglomerados jerárquicos para observar cercanía entre estas y se graficaron con la ayuda de la librería dendextend 0.17.5.

Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) en el software ARLEQUIN v 3.1. para evaluar la distribución de la variación genética en los tres niveles jerárquicos: entre los grupos asignados (viveros y silvestres), entre las poblaciones dentro de los grupos asignados y dentro de las poblaciones.

#### **5.5.4 Análisis de parentesco**

Para evaluar la relación genética a nivel intrapoblacional se tuvo en cuenta el estimador de Queller y Goodnight (1998). Se usó una matriz con los tamaños moleculares usando los 10 microsatélites en el paquete Demerelate de R (Kraemer y Gerlach, 2013). El paquete se usó para calcular los niveles observados de hermanos completos y hermanos medios dentro de cada población y vivero evaluado utilizando el método de genotipo compartido (Mxy) (Blouin *et al.*, 1996). Este método no requiere conocimiento previo de las frecuencias de los alelos de la población y alcanza el nivel más alto de precisión cuando los niveles de heterocigosidad son altos, como fue el caso de las poblaciones con los microsatélites evaluados.

La función Demerelate analiza los niveles de parentesco utilizando un modelo de regresión logística para calcular los umbrales entre hermanos completos y hermanos medios. A continuación, se crearon poblaciones aleatorias de referencia específicas de un lugar, utilizando únicamente los alelos presentes en el sitio y el mismo número de individuos. La prueba Chi cuadrado se usó para comparar la población al azar con las poblaciones empíricas con el fin de evaluar si un sitio en particular contenía un exceso de individuos emparentados, para esto se corrió la función con 1000 iteraciones y pares de individuos al azar.

#### **5.5.4 Análisis de correspondencias múltiples**



Para identificar las asociaciones de mayor peso entre las modalidades de las variables de acuerdo con el perfil molecular obtenido de los alelos de los microsatélites, para los grupos genéticos definidos por el DAPC y los individuos colectados se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM). En este análisis también se incluyeron las tres poblaciones silvestres y los tres viveros con el fin de determinar la distribución en el espacio de cada grupo basado en las características genéticas. Para esto se evaluaron dos formas de agrupamiento, primero tomando como categorías los alelos de los 10 loci en todos los grupos y segundo se escogieron como categorías las 6 poblaciones evaluadas (3 viveros y 3 silvestres). Para el análisis se usó la librería ade4 v.1.6-2 de R conservando los 5 primeros componentes; para la visualización de los resultados se utilizaron las librerías ggplot2 v.1.0. Para tener una mayor resolución de las agrupaciones se realizó una gráfica de los individuos utilizando como variable secundaria la pertenencia a una población, mostrando así de mejor manera los patrones de agrupación de los distintos grupos, utilizando la librería ggplot2 v 1.0.

#### **5.5.5 Identificación de individuos potenciales para el programa de repoblamiento.**

Una vez obtenido los resultados de concordancia genética, los individuos con el perfil genético similar al de la población de Cocora se tomaron como material potencial para el programa de repoblamiento. Las referencias de los individuos se guardaron en una base de datos que se entregó a la CRQ responsable de dicho programa para la conservación de la especie, como parte del convenio con el grupo de palmas de la Universidad Nacional de Colombia (Contrato 315).

## **6. RESULTADOS**

### **6.2 Microsatélites, frecuencias alélicas y número efectivo de alelos**

La información de todos los grupos evaluados está en la Tabla 1. En este apartado solo se evaluaron los tres viveros y la población de Cocora, dado que es la población de interés para el programa de repoblamiento.

En los tres viveros (Jardín, Milán y Roso) y la población silvestre del Valle de Cocora, un total de 136 alelos fueron identificados en los 10 loci, en un total de 88 individuos. El rango de alelos por locus varió de 7 a 21, (en promedio 15). El mínimo número de alelos en Cocora fue de 6 (loci Ca17 y Ca7), en el vivero del Jardín fue de 2 (loci Ca20 y Ca7), en el vivero Milán fue de 2 (loci Ca30 y Ca7) y para el vivero Roso fue 2 (Ca7 y Ca20) (Tabla 2). Los loci Cs30 y Cs3 presentaron el mayor número de alelos observados (21 y 20 respectivamente), mientras que los loci Ca30 y Ca7 presentaron el menor número de alelos observados (7) Los índices de diversidad genética se resumen en la Tabla 4.

**Tabla 1.** Detalles de las poblaciones evaluadas. Tres viveros y tres poblaciones silvestres de *Ceroxylon quindiuense*.

Región	Población	Código población	Categoría	Tamaño muestra
Calarcá-Quindío	Jardín	JB	Vivero	30
Salento-Quindío	Milán	Mi	Vivero	11
Circasia-Quindío	Roso	Ro	Vivero	16
Cocora- Quindío	Valle de Cocora	Co	Silvestre	31
Toche-Tolima	Toche	To	Silvestre	26
La Línea-Tolima	La Línea	Pe	Silvestre	29
<b>Total</b>				<b>143</b>

**Tabla 2.** Longitud en pares de bases (pb) de alelos encontrados para cada locus (recuadro superior) y frecuencia alélica FA (recuadro inferior).

Locus	Grupo	Alelos & FA						
Ca16	JB	150	151					
		0,857	0,143					
	Mi	152	154					
		0,500	0,500					
	Ro	154	156	158	160	162	164	
0,063		0,125	0,375	0,063	0,25	0,125		
Co	154	156	158	160	164	166	168	
	0,067	0,050	0,367	0,083	0,133	0,183	0,117	
Ca17	JB	108	120	122	124	126		
		0,089	0,054	0,339	0,429	0,089		
	Mi	125	130					
		0,550	0,450					
Ro	122	128	156	158	160	164	166	
Ca25	JB	124	128	135	138	142	146	
		0,052	0,052	0,448	0,034	0,259	0,155	
	Mi	120	126					
		0,250	0,750					
	Ro	120	124	128	130	132	152	158
0,031		0,031	0,250	0,188	0,250	0,125	0,125	
Co	124	128	130	132	134	135	138	
	0,032	0,048	0,210	0,484	0,032	0,048	0,097	
Ca30	JB	122	126	130				
		0,946	0,018	0,036				
	Mi	130						
		1,000						
Ro	175	176	178					
		0,024	0,100	0,210				

Para los 10 microsatélites las frecuencias alélicas no estuvieron igualmente distribuidas, encontrando en Cocora y en los viveros alelos con frecuencias superiores al 50% con respecto al resto de los alelos de los microsatélite (Tabla 3). Para el locus Ca7 el alelo 114 se encontró en frecuencias superiores al 50% para las cuatro poblaciones evaluadas, mientras que el alelos 122 del locus Ca30 compartido por Cocora y Jardín también tuvo unas frecuencias muy similares superiores al 50%.

**Tabla 3.** Alelos con frecuencias superiores a 0.5 por cada locus en al menos uno de los cuatro grupos evaluados: Jardín Botánico (JB), Milán (Mi), Roso (Ro), y Cocora (Co).

Locus	Alelos			
	JB	Mi	Ro	Co
Ca16	150	152	0	0
		154		
Ca17	0	125	0	0
		130		
Cs24	186	0	0	0
Cs3	150	0	0	0
Cs5	190	204	0	0

<b>Ca25</b>	0	126	0	0
<b>Ca30</b>	122	130	175	122
<b>Cs30</b>	0	0	0	160
<b>Ca7</b>	114	114	114	114
	130	125	125	
<b>Ca20</b>	142	114	116	0
	150	130	226	

**Tabla 4.** Valores por locus analizados en cada población: Número de alelos (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigocidad observada (Ho), heterocigocidad esperada (He), contenido de información polimórfico (PIC), porcentaje de homocigocidad y heterocigocidad observados (X) promedio.

Locus	Ca16	Ca17	Cs24	Cs3	Cs5	Ca25	Ca30	Cs30	Ca7	Ca20	X
<b>Jardín (JB)</b>											
Na	2	5	3	5	4	6	3	<b>8</b>	2	2	4
Ne	1.32	3.15	1.86	2.86	2.27	3.35	1.11	<b>3.94</b>	2.00	2.00	2.39
Ho	0	0.39	0.35	0.74	0.17	1.00	0.10	1.00	1.00	1.00	0.58
He	0.25	0.68	0.46	0.65	0.56	0.70	0.10	0.75	0.50	0.50	0.51
PIC	0.22	0.63	0.38	0.61	0.50	0.66	0.10	<b>0.71</b>	0.38	0.38	0.46
% H. Obs.	100	60.7	65.4	25.9	82.8	0	89.3	0	0	0	5/10*
% He. Obs.	0	39.3	34.6	74.1	17.2	100	10.7	100	100	100	5/10*
<b>Milán (Mi)</b>											
Na	2	2	4	4	3	2	1	5	2	2	2.70
Ne	2.00	1.98	2.94	<b>3.85</b>	2.17	1.60	1.00	3.67	2.00	2.00	2.32
Ho	0	0.30	1.00	1.00	0.80	0.30	0	0.82	1.00	1.00	0.62
He	0.50	0.50	0.66	0.74	0.54	0.38	0	0.73	0.50	0.50	0.50
PIC	0.38	0.37	0.60	<b>0.69</b>	0.47	0.30	0	0.68	0.38	0.38	0.42
% H. Obs.	100	70	0	0	20	70	100	18	0	0	4/10*
% He. Obs.	0	30	100	100	80	30	0	81.8	100	100	6/10*
<b>Roso (Ro)</b>											
Na	6	7	7	5	8	7	3	5	2	2	5.20
Ne	4.13	3.39	3.97	4.10	<b>6.24</b>	5.17	2.30	3.44	2.00	2.00	3.67

Ho	0.38	0.94	1.00	1.00	0.75	1.00	0.25	1.00	1.00	1.00	0.83
He	0.76	0.71	0.75	0.76	0.84	0.81	0.56	0.71	0.50	0.50	0.69
PIC	0.72	0.66	0.72	0.72	<b>0.82</b>	0.78	0.50	0.66	0.38	0.38	0.63
% H. Obs.	62.5	6.3	0	0	25	0	75	0	0	0	2/10*
% He. Obs.	37.5	93.8	100	100	75	100	25	100	100	100	8/10*
Cocora (Co)											
Na	7	5	11	15	11	8	2	10	6	11	8.60
Ne	4.69	3.27	6.30	<b>9.38</b>	6.91	3.37	1.07	2.20	2.44	6.40	4.60
Ho	0.43	0.27	0.71	0.63	0.61	0.45	0	0.52	0.81	0.28	0.47
He	0.79	0.69	0.84	0.89	0.86	0.70	0.06	0.55	0.59	0.84	0.68
PIC	0.76	0.63	0.82	0.88	0.84	0.68	0.06	0.53	0.53	0.83	0.66
% H. Obs.	56.7	73.3	29	36.7	38.7	54.8	100	48.39	19.4	72.4	5/10*
% He. Obs.	43.3	26.7	71	63.3	61.3	45.2	0	51.6	80.6	27.6	5/10*

\*Número de loci con heterocigosidad superior al 50% sobre número total de loci evaluados. Los valores más altos para Na, Ne, He y PIC están resaltados en negrilla.

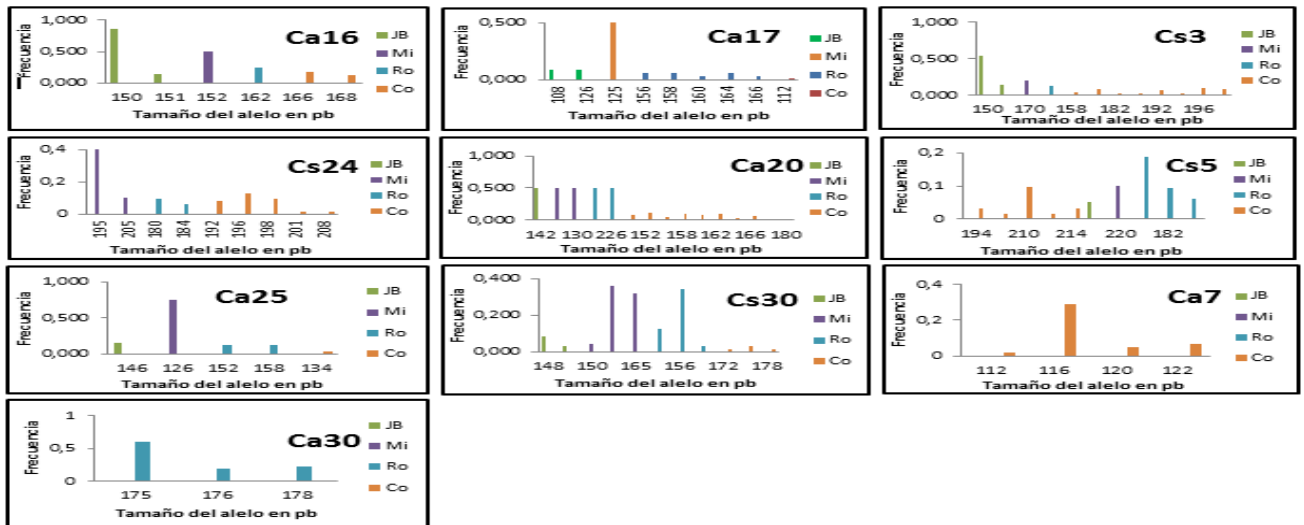
## 6.2 Diversidad genética: población silvestre de *Ceroxylon quindiuense* (Valle de Cocora) y viveros

Una diferenciación genética sustancial fue observada entre los tres viveros y la población de Cocora. En total, siete parámetros genéticos fueron analizados. La heterocigosidad observada (Ho) varió entre 0.47 y 0.83, el mayor valor se encontró en el vivero Roso y el menor valor se encontró en el vivero Jardín. La diversidad genética (He) varió entre 0.50 a 0.69, siendo mayor en el vivero Roso y menor en el vivero Milán.

En la población silvestre, se obtuvo una proporción alta de alelos privados comparado con los viveros (37 versus 11, respectivamente), es decir, de alelos que no fueron recuperados en los viveros. La Figura 2 muestra un resumen comparativo de los patrones de bandas entre los tres viveros y la población de Cocora. Los patrones de bandas fueron homogéneos con respecto al número de bandas, número de bandas con frecuencia baja, y el número de alelos privados (Fig. 2). En cuanto a los alelos privados las frecuencias variaron entre 0.1 y 0.6

(Fig. 1). En el microsatélite Ca07 sólo se encontraron alelos privados en Cocora, y en Ca30 sólo se encontraron alelos privados en el vivero del Jardín (Fig. 1).

El número efectivo de alelos ( $N_e$ ), definido como el número requerido de alelos con igual frecuencia alélica para predecir la heterocigosidad (Tabla 4) se halló para cada locus en cada población evaluado. El  $N_e$  más alto en el Jardín fue 3.9 (Cs30), en Milán fue 3.8 (Cs03), en Roso fue 6.2 (Ca30) y en Cocora fue 9.4 (Cs03). El  $N_e$  más bajo en Jardín fue 1.1 (Ca30), en Milán fue 1 (Ca30), en Roso fue 2 (Ca20 y Ca07) y en Cocora fue 1.06 (Ca30) (Tabla 4). Se detectó una correlación positiva significativa entre la diversidad genética y el número de alelos por locus (Fig. 3).



**Figura 1.** Frecuencia de alelos privados por loci para los viveros Jardín (JB), Milán (Mi), Roso (Ro) y la población del Valle de Cocora (Co).

### 6.3 Heterocigosidad y contenido de información polimórfica (PIC)

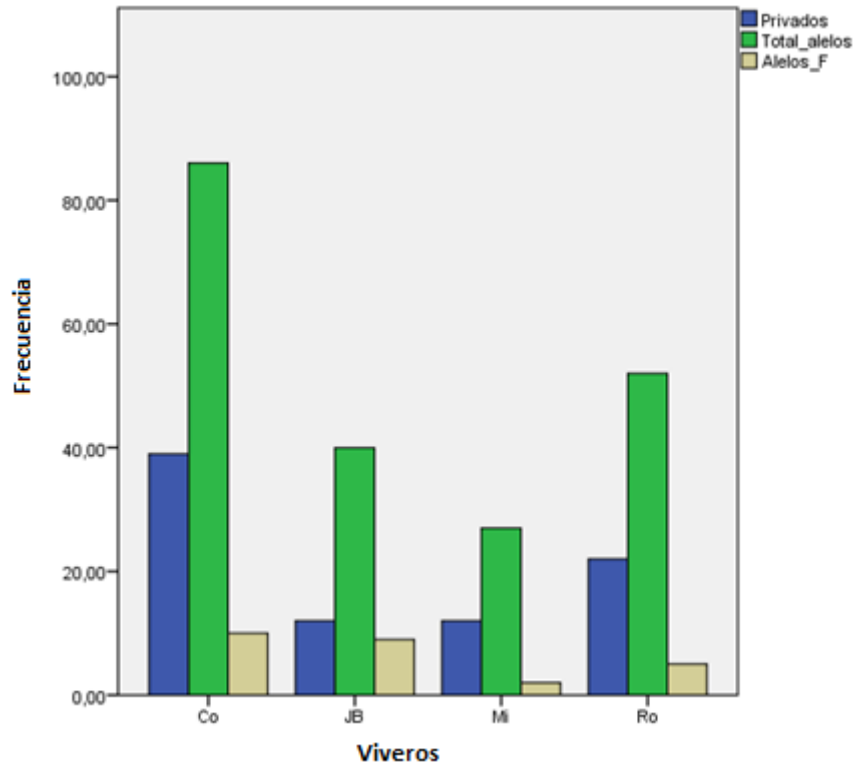
El porcentaje de heterocigosidad observada fue mayor que el de homocigosidad en Milán y Roso, mientras que en el Jardín y en la población silvestre de Cocora el porcentaje de homocigosidad y heterocigosidad fue igual (50%). Los loci con menor porcentaje de heterocigosidad observada fueron el Ca16 en Jardín y Milán y Ca30 en Roso y Cocora (Tabla 4).

Los diez loci evaluados fueron polimórficos. El PIC promedio en el Jardín fue 0.46, en Milán fue 0.424, en Roso fue 0.633 y en Cocora 0.66. Los valores PIC en cada población se separaron por rangos, para determinar el nivel de información aportado por cada locus. Los valores menores a 0.25, se catalogaron como poco informativos, valores entre 0.26 y 0.5 se catalogaron como medianamente informativos y valores superiores a 0.5 se catalogaron como muy informativos. Tomando todas las poblaciones evaluadas, el locus más informativo fue el Cs03 (PIC= 0.73), y el menos informativo fue el locus Ca30 (PIC=0.17). Para determinar el porcentaje de información de los microsatélites, se tomó el número de loci con valores superiores a 0.5 y se dividió por el total de los loci evaluados; 40% de los loci evaluados aportaron gran información para el Jardín, en Milán fue el 30%, en Roso fueron el 70% y en Cocora fueron el 90%. Los loci más informativos en todas la poblaciones fueron Cs30 y Cs03 (100%), y Ca25, Cs24 y Ca17 (75%) (Tabla 5).

**Tabla 5.** Contenido de información polimórfico PIC por loci, amarillo valores superiores a 0.5; azul valores entre 0.5- 0.25; rojo valores inferiores a 0.25.

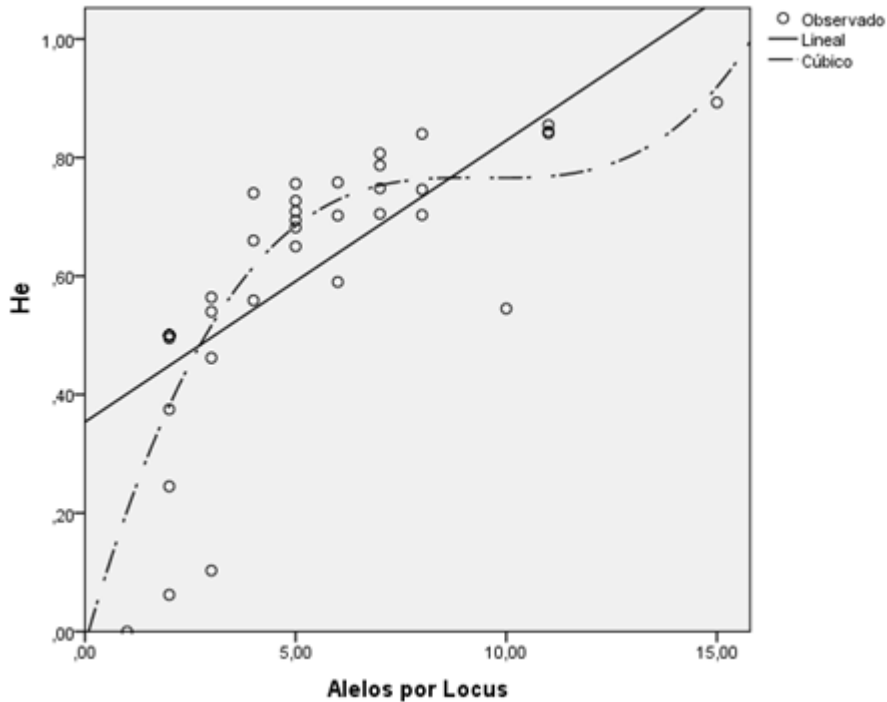
Locus	JB	Mi	Ro	Co	Promedio	% Información/ población
Ca16	0.22	0.38	0.72	0.76	0.52	50
Ca17	0.63	0.37	0.66	0.63	0.57	75
Cs24	0.38	0.60	0.72	0.82	0.63	75
Cs3	0.61	0.69	0.72	0.88	0.73	100
Cs5	0.50	0.47	0.82	0.84	0.66	50
Ca25	0.66	0.30	0.78	0.68	0.60	75
Ca30	0.10	0.00	0.50	0.06	0.17	0
Cs30	0.71	0.68	0.66	0.53	0.64	100
Ca7	0.38	0.38	0.38	0.53	0.41	25
Ca20	0.38	0.38	0.38	0.83	0.49	25

%Información/ locus	40	30	70	90		
------------------------	----	----	----	----	--	--



**Figura 2.** Resumen de alelos en los 10 loci evaluados en los tres colecciones (JB- Jardín, Mi- Milán, Ro- Roso) y en la población del Valle de Cocora (Co). Azul número de alelos privados, verde número total de alelos, café claro número alelos con baja frecuencia (<5%). Una prueba de homogeneidad Chi-cuadrado entre las colecciones y la población no dio evidencia para refutar la hipótesis nula de que las poblaciones son homogéneas con respecto a las tres categorías de alelos: p-valor =0,213.





**Figura 3.** Correlación entre la Heterocigosidad esperada y el número de alelos por locus ( $R^2=0.523$   $p<0.001$ )

#### 6.4 Estructura genética poblacional entre viveros y poblaciones silvestres

En cuanto a estructura genética se compararon los tres viveros con tres de las poblaciones silvestres, Cocora, Toche y La Línea. Todos los índices sugieren un nivel significativo de diferenciación. El valor global de  $F_{st}$  para las 6 poblaciones fue de 0.30 ( $p<0.05$ ). De igual forma el valor de diferenciación genético global de  $D$  de Jost ( $Dest$ ) fue de 0.76 ( $p<0.001$ ). El valor de  $G_{st}$  fue de 0.29 ( $p<0.001$ ). Dado que los principios de diferenciación son similares entre el  $F_{st}$  y el  $G_{st}$  solo se realizaron las comparaciones pareadas con el  $G_{st}$  y el  $Dest$ , los cuales también aportaron evidencia significativa sobre los niveles de estructuración (Tabla 6).

El Análisis de Varianza Molecular AMOVA sugiere que el 67% ( $p<0,001$ ) de la variación se explica por las diferencias significativas dentro de cada una de las 6 poblaciones evaluadas y el 35% ( $p<0,001$ ) de la variación es explicada por las

diferencias entre las poblaciones dentro de los grupos establecidos (viveros vs silvestres). El análisis no mostró variación sustancial significativa entre los grupos, por lo cual la variación se presenta a nivel de población no de grupos (Tabla 7). El AMOVA mostró que las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones fueron significativas en los 10 microsatélites analizados.

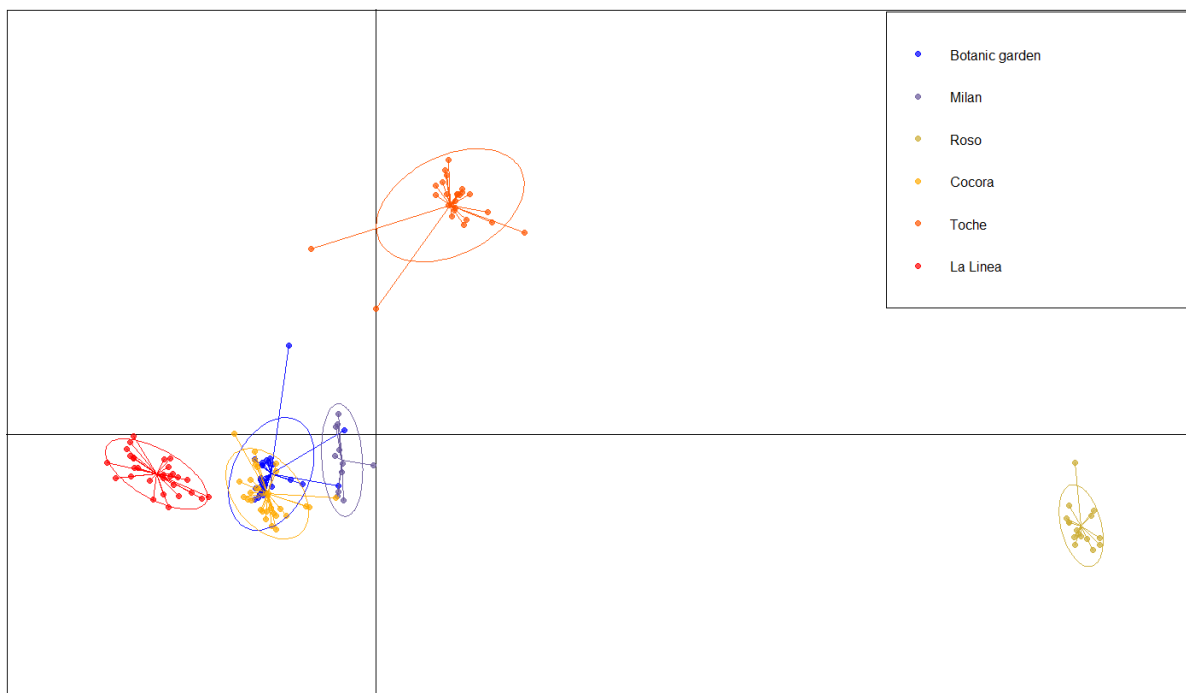
**Tabla 6.** Índices de estructura genética. *Gst* debajo de la diagonal y *Dest* arriba de la diagonal. Todos los valores fueron significativos  $p < 0.001$ .

	To	Pe	Co	JB	Mi	Ro
To	*	0,69	0,89	0,92	0,86	0,82
Pe	0,29	*	0,94	0,78	0,84	0,82
Co	0,32	0,34	*	0,61	0,79	0,55
JB	0,41	0,39	0,28	*	0,90	0,82
Mi	0,37	0,38	0,34	0,46	*	0,76
Ro	0,30	0,31	0,24	0,38	0,31	*

**Tabla 7.** Análisis de varianza molecular AMOVA para los 3 viveros y las 3 poblaciones silvestres de *Ceroxylon quindiuense*. Los niveles de significancia fueron evaluados a través de 1000 permutaciones.

Estructura	Fuente de variación	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico F de probabilidad
Jardín Milán Roso	Entre grupos	69.120	-0.09809	-2.11685	Fct = -0.02117 P= 0.723
	Entre poblaciones dentro de los grupos	304.194	1.63368	35.25780	Fst = 0.33141 p<0.001

<b>Cocora</b>	Dentro de las poblaciones	842.963	3.09794	66.85905	Fsc =
<b>Toche</b>					0.34527
<b>La Línea</b>					p<0.001

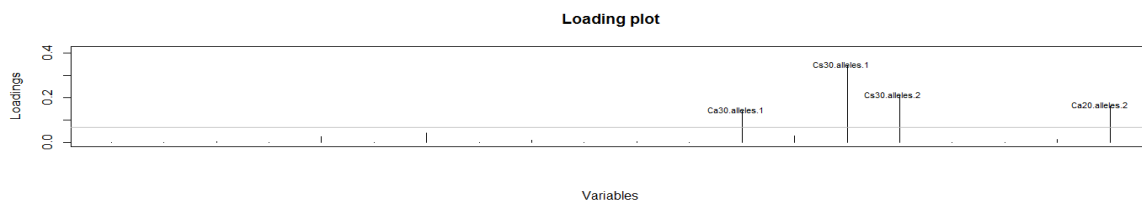


**Figura 4.** Análisis discriminante de componentes principales DAPC con 6 agrupaciones (*k*-means). Perfil genético basado en 10 microsatélites, los 143 individuos colectados de 6 sitios diferentes (3 poblaciones silvestres y 3 viveros de *Ceroxylon quindiuense*) claramente describen 6 agrupaciones genéticas con la mayoría de individuos dentro del intervalo de confianza del 95% de asignación representado por las elipses. Cada punto representa un individuo y cada elipse representa la agrupación genética asignada para cada vivero y población

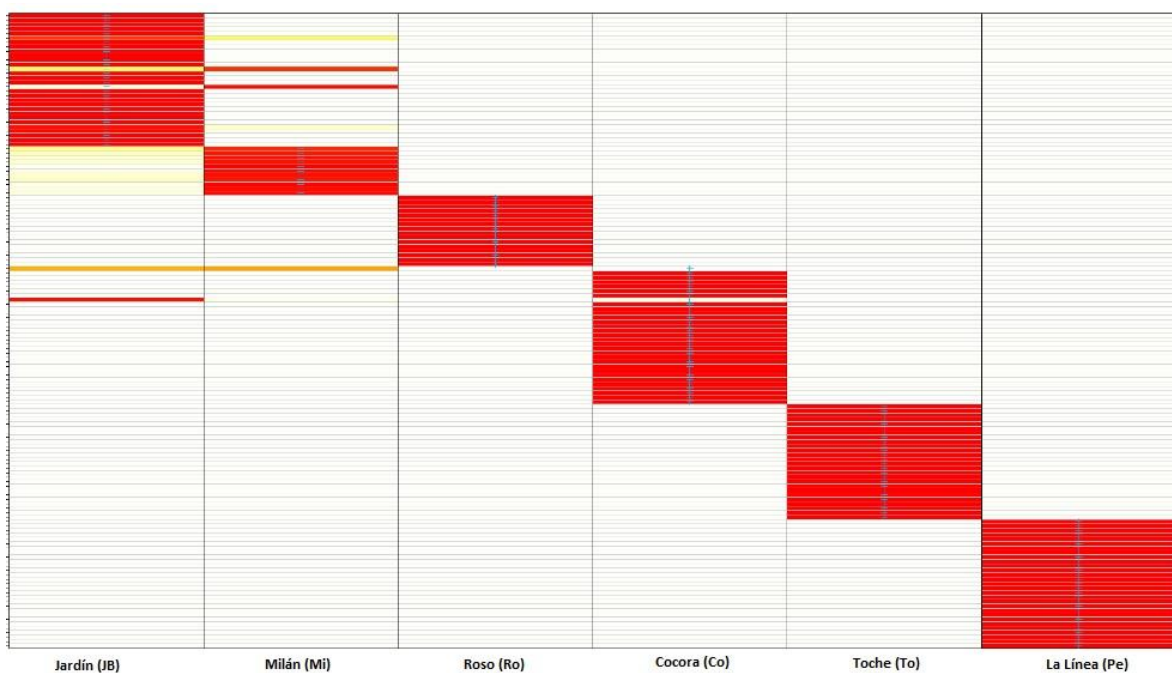
El Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC) también detectó una clara separación entre los seis grupos. Principalmente, las poblaciones silvestres Cocora, Toche y La Línea están bien estructuradas entre sí. Esto, en

comparación con los viveros, en los que hay similitud entre el Jardín y Milán, que a su vez se asemejan a Cocora.

Para ambos análisis DAPC y ACM el vivero del Jardín está fuertemente relacionada con la población de Cocora, mientras que el vivero que más se diferenció fue el de Roso, donde en el DAPC se observó muy alejado del resto de los grupos (Fig. 4). Se observó también que los loci Ca20, Cs30 y Ca30 son los que más están contribuyendo a la diferenciación de las poblaciones, ya que son los loci con mayor cantidad de alelos raros (frecuencia < 0.1) o alelos con alta frecuencia (Fig. 5).



**Figura5.** Representación gráfica de los alelos que contribuyen mayormente a la diferenciación de las agrupaciones basados en los resultados del DAPC.



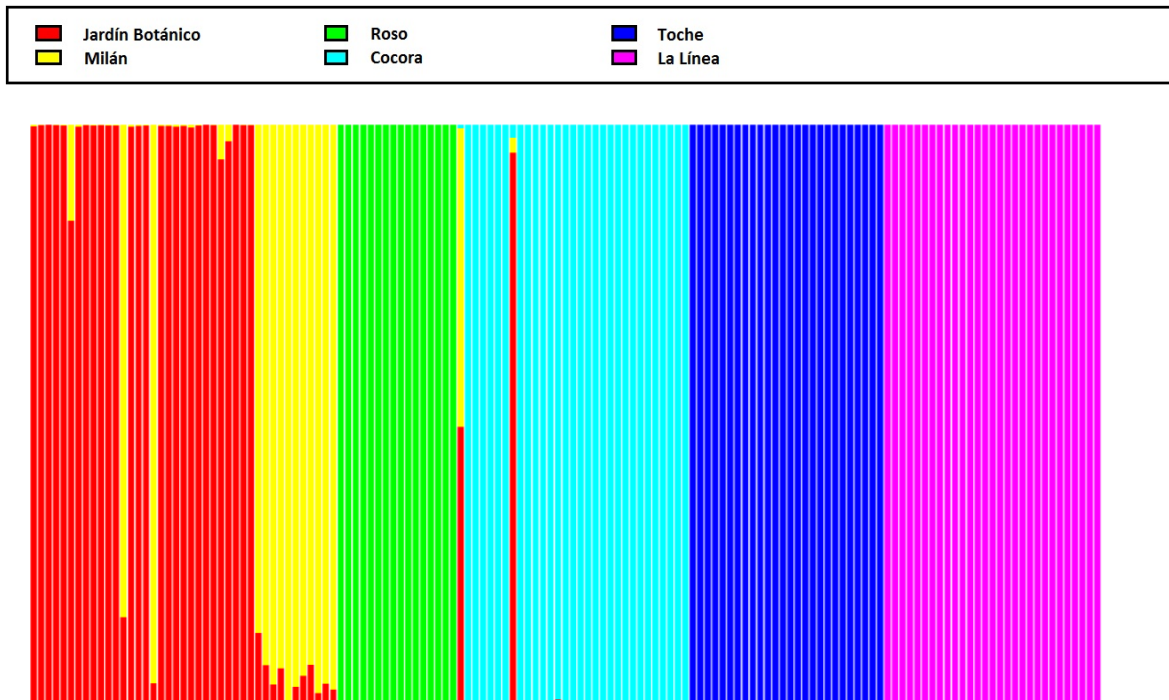
**Figura 6.** Representación gráfica de las probabilidades de pertenencia de cada individuo en los diferentes grupos evaluados. Cada casilla indica la probabilidad de pertenencia (rojo=1, blanco=0); Líneas amarillas representan probabilidades intermedias. La línea azul representa la agrupación previa prevista para el DAPC. En el eje x, renglones de 1 al 30 individuos del Jardín, renglones del 31 al 41 individuos de Milán, renglones del 42 al 62 individuos de Roso, renglones del 63 al 94 individuos de Cocora, renglones del 95 al 121 individuos de Toche, renglones del 122 al 143. Eje y, agrupaciones realizadas, columna 1 Jardín, columna 2 Milán, columna 3 Cocora, columna 4 Toche y columna 5 La Línea.

#### **6. 4. 1 Probabilidad de pertenencia**

Con base a la matriz de funciones discriminantes se realizó una representación gráfica para evaluar la pertenencia de cada individuo a los grupos asignados en el DAPC (Fig. 4), las probabilidades de pertenencia se basaron en la retención de las funciones discriminantes. Se observó que la mayoría de los individuos en cada grupo concuerda con los agrupamientos arrojados por el DAPC (Fig. 4). De igual forma se observa que la probabilidad de que cada individuo pertenezca al grupo asignado en el DAPC es de 1, a excepción del individuo JB43 el cual se clasifica en el grupo 2 (Milán) con una probabilidad alta, pero el DAPC lo posiciona en el grupo 1 (Jardín). A pesar de la alta diferenciación entre los individuos de los distintos grupos, se observó mezcla en algunos individuos, como la mayoría de los individuos de Milán que presentan una probabilidad baja de pertenencia (amarillo) con el Jardín y también para el individuo Co299 de Cocora que se encuentra ubicado con baja probabilidad en Milán y Jardín (Fig. 6).

La Figura 9 muestra la composición genética de los individuos en cada grupo con la función STRUCTURE-like. Se observa una alta estructuración entre las 6 poblaciones evaluadas. Para las poblaciones silvestres la estructura genética poblacional de *C. quindiuense* separa a los individuos de las poblaciones de Toche, La Línea y Cocora. En comparación con los viveros, Roso se encuentra

completamente diferenciado de los otros grupos (silvestres y viveros) como se observó en el DAPC; mientras que el Jardín y Milán hay una mayor relación. Entre los viveros y las poblaciones silvestres solo en Cocora se observa señal de mezcla con Milán y el Jardín, el resto de grupos se observan muy estructurados.



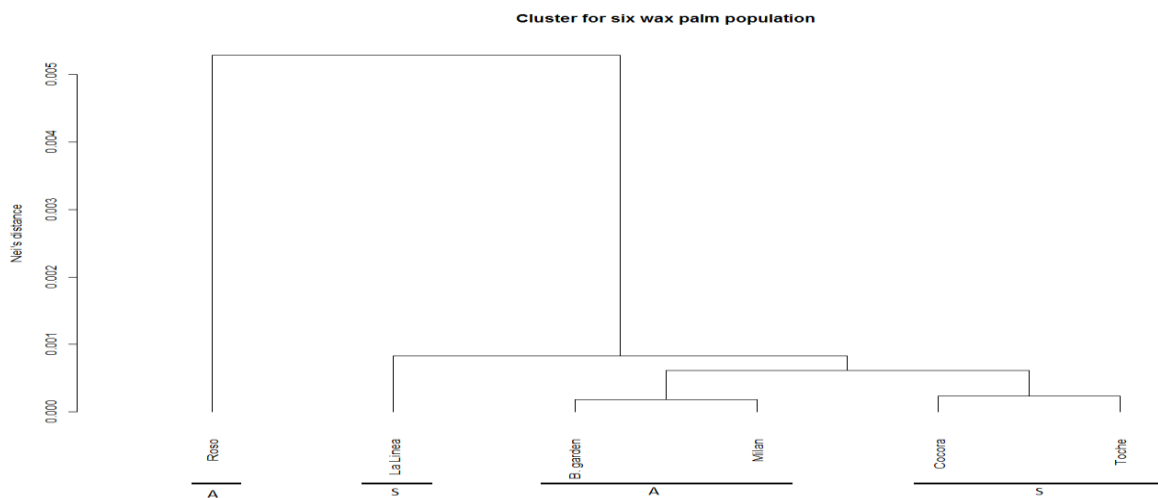
**Figura 7.** Representación gráfica de la composición genética de todos los individuos evaluados. Análisis de pertenencia a grupos para todos los individuos. Cada línea representa un individuo y los colores representan a los grupos genéticos, tales que la proporción de color para cada individuo indica su probabilidad de asignación a la agrupación genética.

### 6.5 Patrones genéticos

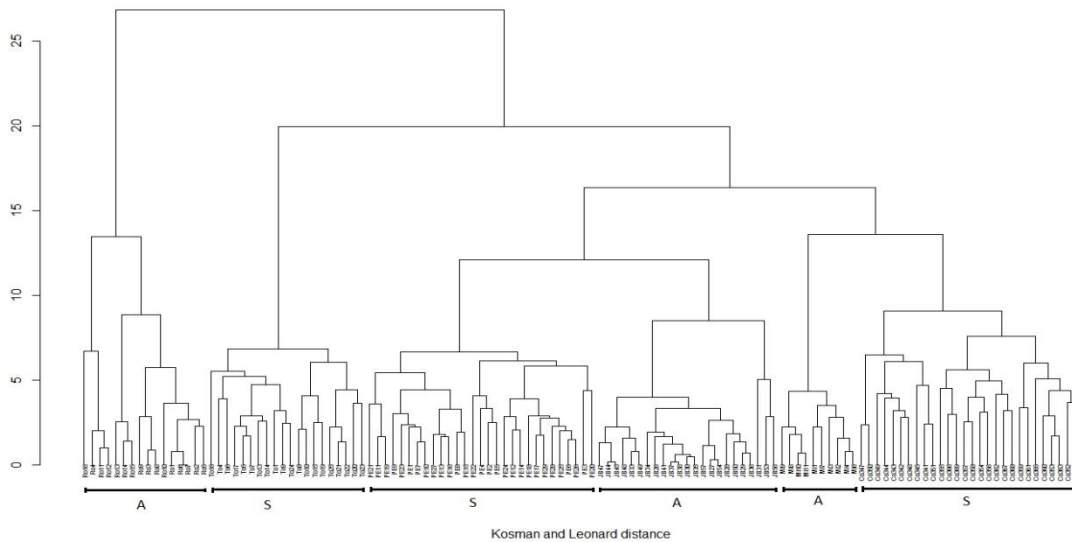
En el dendograma de similitud (Fig. 8) se evidenció una distancia genética pequeña entre el grupo Jardín- Milán y el grupo Cocora-Toche; de igual forma, estos clados están separados por una distancia genética pequeña. La relación genética entre Toche y Cocora probablemente se deba a la cercanía entre las poblaciones, mientras que en el caso de los viveros la similitud este dada por la procedencia de una misma población inicial. Dado que se conoce que la

procedencia de los individuos de Milán son de Cocora, hay un grado de certeza al inferir que el vivero del Jardín tenga mayor probabilidad de provenir de palmas de Cocora que de Toche o la Línea. Por otro lado, se obtiene que Roso está más distante del resto de las poblaciones y viveros, por lo que no hay una relación clara de este vivero con las poblaciones silvestres evaluadas.

De igual forma, los análisis de conglomerados basados en las distancias de Kosman y Leonard (2005) (Fig. 9) mostraron los mismo patrones de agrupamiento que en los conglomerados con distancias genéticas, basándose en la frecuencia genotípica, mostrando que los individuos de Milán están mucho más relacionados con Cocora, lo que concuerda teniendo en cuenta la información *a priori* de procedencia del vivero. De igual modo, el Jardín aunque se encuentra agrupado en este caso con La Línea, no se encuentran muy distantes (en un rango de 0.001 a 0.002 unidades de distancia) de Cocora y Milán.



**Figura 8.** Agrupamiento jerárquico entre poblaciones usando distancias de Nei (1973) (A) viveros, (S) poblaciones silvestres.

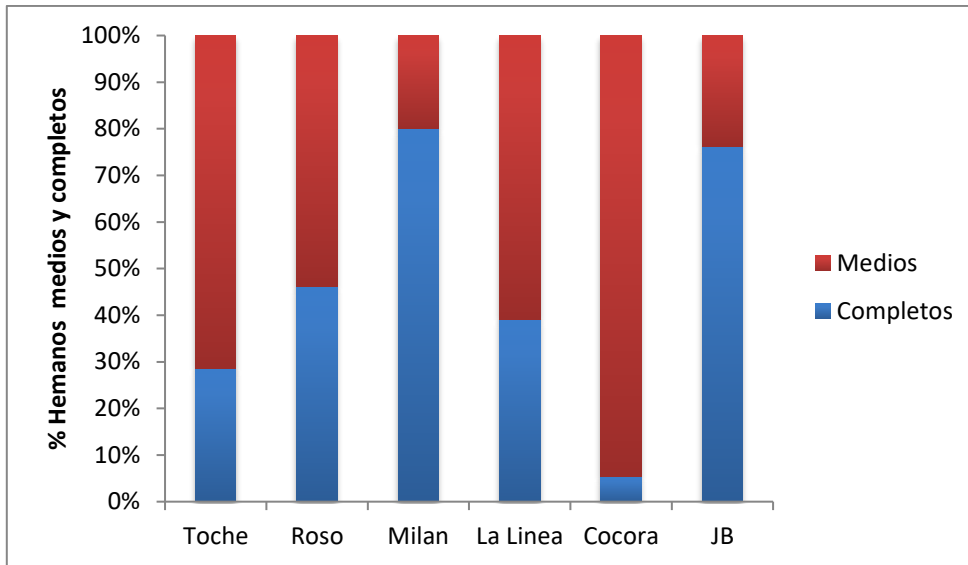


**Figura 9.** Agrupamiento jerárquico entre poblaciones usando distancias genéticas de Kosman y Leonard (2005) (A) viveros, (S) poblaciones silvestres.

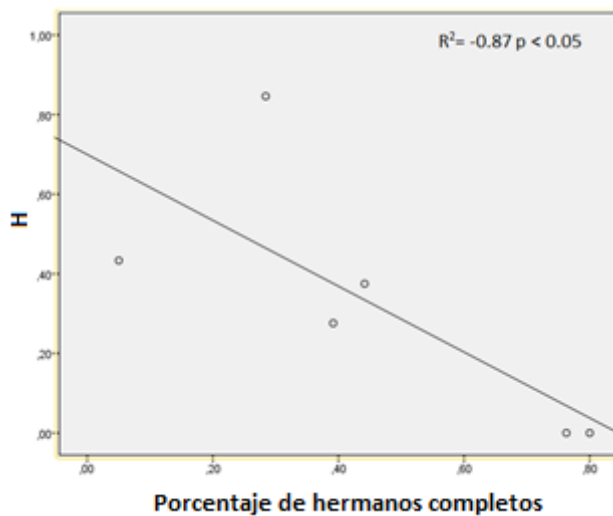
### 6.5.1 Análisis de parentesco

Las relaciones de parentesco sugieren en general que los viveros evaluados tienen niveles significativamente altos de hermanos completos, en el caso del Jardín y Milán los valores superan el 50% de hermanos completos en la población ( $p < 0.001$ ). Sin embargo, en Roso la proporción entre hermanos completos y medios está en igual proporción. Por otro lado, Cocora presentó un menor porcentaje de hermanos completos respecto a los hermanos medios (5%,  $p < 0.001$ ), seguido de Toche y la Línea (hermanos completos menor al 50%,  $p < 0.001$ ) (Fig. 10). Se obtuvo una correlación negativa entre la diversidad genética y el porcentaje de hermanos completos ( $p < 0.001$ ) (Fig. 11).





**Figura 10.** Análisis de parentesco. Porcentaje de hermanos completos (azul) y porcentaje de hermanos medios (rojo) por cada población evaluada. Los valores de parentesco fueron calculados usando 1000 aleatorizaciones por población. Todos los valores fueron significativos ( $p < 0.001$ ).



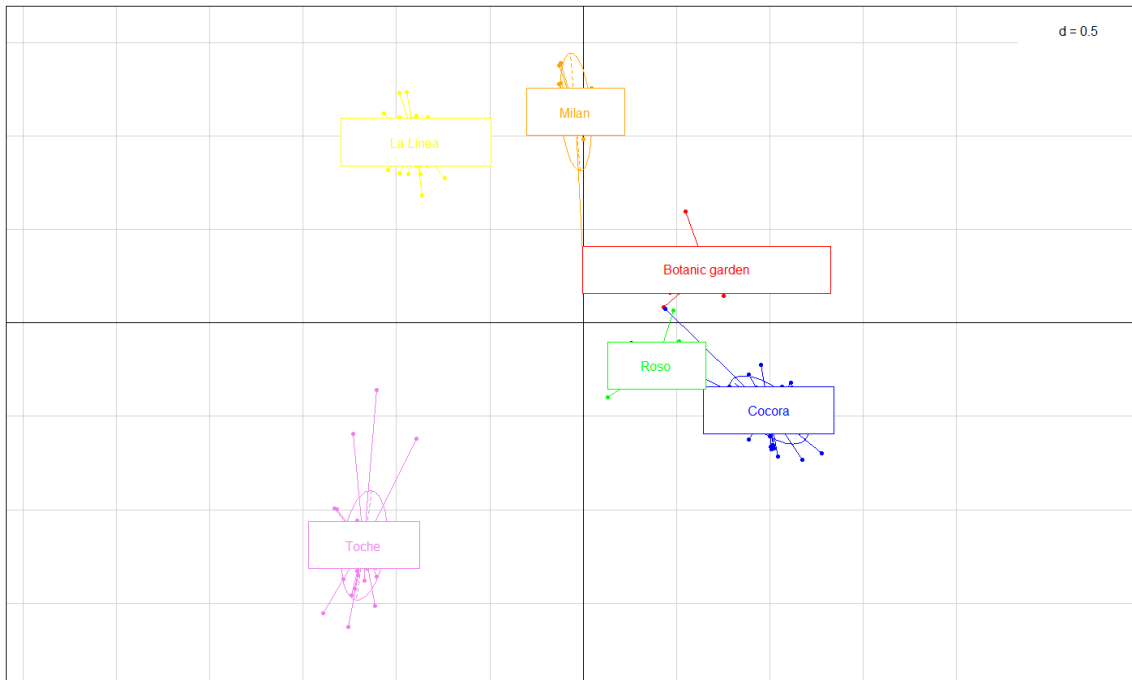
**Figura 11.** Correlación entre el porcentaje de hermanos completos (eje x) y la diversidad genética (H- eje y) en las poblaciones silvestres y en los viveros.

### 6.5.2 Análisis de correspondencia múltiple

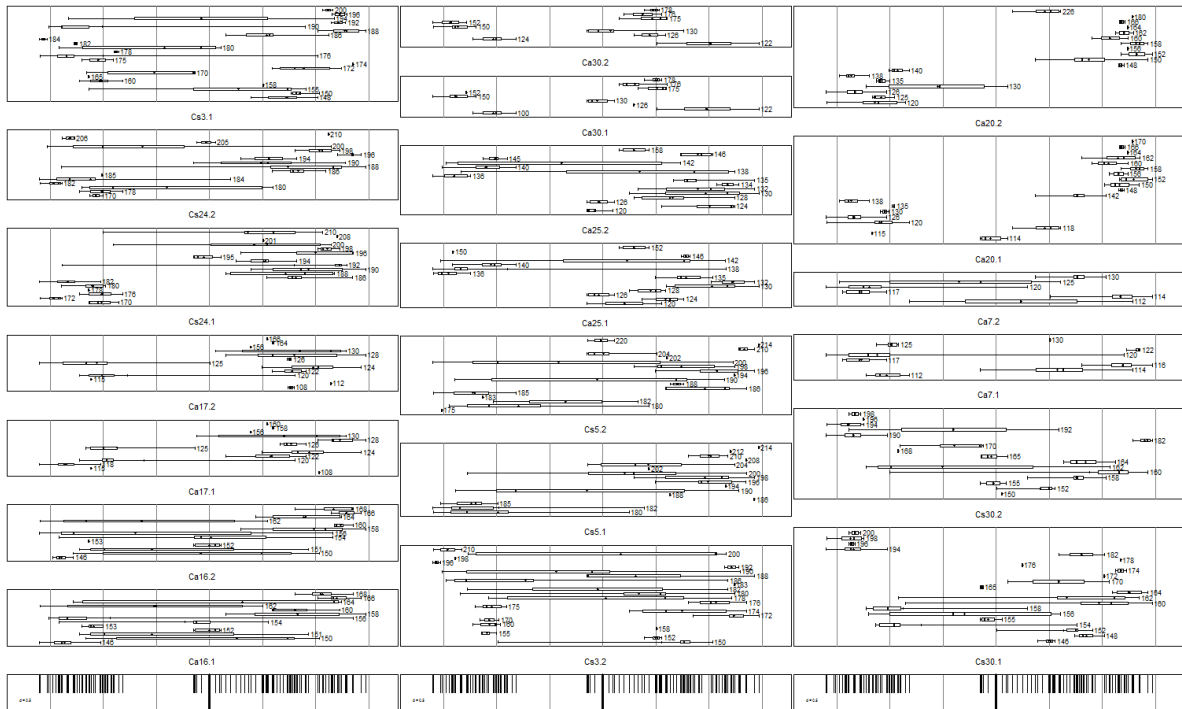
El primer eje explica el 76% de la varianza, y el segundo eje el 65%. En la Figura 14a la tendencia de agrupamiento no es muy clara, ya que, los alelos de los loci evaluados se distribuyen ampliamente en el mapa lo que hace difícil relacionar la cercanía entre los viveros y cualquier población silvestre, dado el alto porcentaje de alelos compartidos (58,5%). Por otro lado, la Figura 12b muestra una agrupación más definida. Se observa que los individuos de Cocora (amarillo) tienen una gran cercanía con los individuos del Jardín (rojo) y de Roso (azul oscuro), de igual forma los individuos de Milán tienen a estar más cercanos a el Jardín y La Línea, mientras que la población de Toche se encuentra bastante alejado del resto de grupos. Sin embargo, se observa que la mayor diversidad (basado en el número de alelos) se encuentra en las poblaciones silvestres, mientras que los viveros muestran un menor número de alelos en proporción (Fig. 12a). En la gráfica de dispersión del ACM (Fig. 13) se puede apreciar mejor que la población de Toche está muy diferenciada del resto de las poblaciones incluyendo los viveros evaluados, mientras que La Línea tiende a estar más cercana a los otros grupos, sin embargo componen un grupo aparte. A pesar del bajo porcentaje de inercia entre los ejes, se observa una segregación clara de las poblaciones. Los individuos del Jardín (JB) tienen una gran cercanía con Cocora (Co), Milán (Mi) y Roso (Ro).



**Figura 12.** Análisis de correspondencia múltiple (A) Agrupaciones por alelos compartidos (B) Agrupaciones por poblaciones evaluadas Cocora, Roso, Milán, Jardín, Toche, La Línea.



**Figura 13.** Gráfico de dispersión usando al nombre de la población como variable secundaria para mostrar la separación genética entre poblaciones. 1 eje: 5.48% de inercia; 2 eje: 4.687% de inercia; 3 eje 4.597% de inercia; 4 eje: 4.093 % de inercia; 5 eje: 3.699% de inercia; inercia total: 22.515.



**Figura 14.** Cajas de frecuencias de los diferentes alelos de los 10 loci evaluados en los tres viveros y las tres poblaciones silvestres.

## 7. DISCUSIÓN

El conocimiento de las bases genéticas de las poblaciones y especies amenazadas es un aspecto importante para la conservación (Frankham *et al.*, 2002; Allendorf y Luikart, 2007). En este caso se comparó la concordancia genética de tres viveros del departamento de Quindío, corroborando la procedencia de dichos viveros con la población silvestre del Valle de Cocora. Estos resultados constituyen un insumo fundamental, al establecer que los individuos de *C. quindiuense* de los viveros del departamento del Quindío son compatibles y aptos para introducción en el Valle de Cocora.

## 7.1 Concordancia genética

Los resultados obtenidos con el DAPC y el análisis de asignación basado en las funciones discriminantes del mismo, mostraron resultados semejantes (Fig. 4 y 8). El Jardín evidencia solapamiento con los individuos del Cocora y con los individuos de Milán aunque con este último en menor medida. La cercanía entre Milán y Cocora corrobora la similitud genética entre el la población silvestre y el vivero del cual se tiene conocimiento de que provienen de Cocora. De igual forma la cercanía de Milán con los individuos del Jardín permitieron inferir que muy probablemente estos individuos también provengan de Cocora y no de poblaciones cercanas como Toche y La Línea. De hecho, no se evidenció ninguna señal de mezcla con estas poblaciones (Fig. 7).

Así mismo, la probabilidad de asignación a los grupos mostró que las poblaciones son unidades diferentes; en el caso de Toche, La Línea y el Vivero Roso, las probabilidades de reasignación son de 1, iguales a los agrupamientos hechos por el DAPC. Sin embargo, en el caso de Cocora, Milán y el Jardín existen individuos que muestran un cierto grado de mezcla entre ellos. Una posible explicación para la similaridad entre el Jardín y Milán se deba a que los individuos muestreados en su mayoría son hermanos medios, mientras que en relación a Cocora, los individuos de los viveros puedan provenir de la zona pero no necesariamente son parientes directos. Sin embargo, aunque no se pueda establecer una relación directa entre los parentales y la progenie, dado la falta de información de procedencia de los individuos de los viveros, se puede establecer que existe un alto grado de concordancia genética entre los viveros Milán y Jardín respecto a Cocora, dadas las evidencias de mezcla resultado de las funciones de asignación (Fig. 6) y estructura (Fig. 7) del DAPC (Fig. 4).

En la función STRUCTURE-Like, no sólo se mostró la reducción de la diversidad genética dada la alta estructuración de las poblaciones evaluadas, sino también los cambios en la composición genética en los viveros comparada con las poblaciones silvestres. Estos resultados pudieron ser causados por el reducido

número de individuos por vivero como es el caso de Milán y Roso. En el vivero del Jardín, aunque el número de individuos es casi igual al evaluado en las poblaciones silvestres, la forma de colecta (gran porcentaje de hermanos completos, ver análisis de parentesco Fig. 10) influyó en la reducción de la diversidad y la composición genética del mismo (Li-Q *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Yokogawa *et al.*, 2013).

En Milán y el Jardín hay un mayor número de alelos con frecuencias superiores al 50% (Tabla 2), debido a que en el Jardín, aunque el número efectivo no es pequeño, el grado de parentesco entre los individuos genera una mayor representatividad de ciertos alelos que de otros. Por otro lado, en Milán el número pequeño de individuos genera que la probabilidad de encontrar los mismos alelos en toda la población sea más alta que en viveros con un tamaño más grande. Situaciones similares de alta estructuración y baja diversidad genética en poblaciones silvestres y naturales asociadas al tamaño poblacional pequeño y a estrategias de manejo poco adecuadas, se han evidenciado en otras especies (Williams y Davis, 1996; Hollingsworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Li-Y.Y. *et al.*, 2005; Yokogawa *et al.*, 2013).

Por otra parte, el vivero Roso, la población silvestre de Toche y La Línea no fueron agrupados juntos en el DAPC, ni en las funciones discriminantes y STRUCTURE-like (Fig.6 y 9). Estos resultados indican que no hay concordancia genética entre el vivero Roso y ninguna de las poblaciones silvestres evaluadas, mientras que Milán y el Jardín tienen una composición genética que no es sustancialmente diferente de la población silvestre de Cocora, mientras sí lo son de las otras dos poblaciones silvestres de Toche y La Línea.

## **7.2 Patrones genéticos entre poblaciones silvestres y viveros**

La conformación de los viveros no reconocidos como Roso y Milán se ha limitado a la obtención de plántulas o la germinación de semillas provenientes de unas

pocas palmas femeninas productivas y de fácil acceso (obs. pers.), sin embargo, esto hace que las colecciones no sean representativas de la población fuente (Helenurm y Parsons, 1997; Li-Y.Y *et al.*, 2005) dado que se seleccionan solo ciertos genotipos por lo cual se puede incurrir en un efecto fundador o de deriva. Por tal razón, se puede inferir que los viveros evaluados tienen mayor similitud solo con aquellos lugares de donde se obtuvieron, como fue el caso de Milán y el Jardín respecto a Cocora, diferenciándose de los otros lugares. Situaciones similares se evidencia en estudios realizados por Etisham-UI-Haq *et al.*, (2001) y Li-Y.Y *et al.*, (2005).

Los patrones de distancias genéticas de Nei entre los tres viveros y las tres poblaciones silvestres mostraron que sólo los viveros de Jardín y Milán forman grupos hermanos con el grupo conformado por las poblaciones de Cocora y Toche. Esto indica que posiblemente las plántulas o semillas recolectadas para la conformación de los viveros (Milán y Jardín) puede haber partido del grupo hermano (Cocora y Toche). Esto también sugiere que ninguna población silvestre ha contribuido genéticamente a el vivero Roso dada la amplia distancia genética observada. El material de este vivero corresponde a individuos provenientes de poblaciones genéticamente distintas a las tres evaluadas. Resultados similares fueron obtenidos con los análisis de distancias de Kosman y Leonard (2005), siendo Milán y Cocora el grupo hermano de la agrupación Jardín y La Línea (Fig. 9). La relación en distancias de cada individuo de cada grupo fue consistente con los agrupamientos realizados con el DAPC y la función de asignación (Fig.6). Del mismo modo, la relación entre los viveros Milán, Jardín y la población silvestre Cocora sigue siendo concordante en cuanto a la cercanía genética en ambos análisis realizados.

Los resultados combinados de los diferentes análisis estadísticos (Fst, Dest, Gst, AMOVA) proporcionaron valores significativos de estructura. Todas las comparaciones pareadas de diferenciación genética usando Gst y Dest fueron altamente significativas (Tabla 6).



A pesar de que hay una concordancia genética, los valores de diferenciación genética son significativos. Esto puede explicarse de varias maneras. En primer lugar, los muestreos desiguales de las poblaciones silvestres con distintos genotipos pueden resultar en una composición genotípica sesgada. La obtención de semillas o plántulas de unos pocos individuos en lugar de obtenerlos de semillas o plántulas representativas de todo el acervo génico tiende a crear cuellos de botella y efectos fundadores durante el establecimiento de las poblaciones *ex situ* (Miller y Schaal, 2006; Burgarella *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2015). Este sesgo conduce a divergencias genéticas marcadas y a posteriores efectos negativos en el éxito de las poblaciones *ex situ* (Enßlin *et al.*, 2011; Miao *et al.*, 2015).

De igual forma, la selección artificial puede también disminuir la diversidad genética de las poblaciones cultivadas (Tanksley y McCouch. 1997; Abbo *et al.*, 2003; Miao *et al.* 2015). Lo anterior también se puede evidenciar en el número de alelos privados para cada población evaluada, donde por ejemplo en Cocora el número de alelos privados es mayor con respecto a los tres viveros, lo que indica que varios de los alelos de la población silvestre no están siendo rescatados en las colecciones (Fig. 4). La gran cantidad de alelos que no están representados en los viveros pueden contribuir a una variación genética sustancial (66.8%) entre todas las poblaciones (silvestres y colecciones) evaluadas ( $F_{sc} = 0.34527$   $p < 0.001$ ) (Tabla 7). Además, el AMOVA muestra que dentro de los grupos definidos como viveros y silvestres se presenta también una gran variación (35.2%) que fue estadísticamente significativa ( $F_{st} = 0.33141$   $p < 0.001$ ).

### **7.3 Poblaciones silvestres**

Se encontró una alta significancia ( $< 0.001$ ) de la estructura genética en las poblaciones silvestres, dado por los valores de estructuración (Tabla 6) y por el agrupamiento hecho con el DAPC (Fig. 4). Posiblemente lo anterior sea resultado del aislamiento reproductivo entre las poblaciones, evidenciado también en la falta de individuos que muestran mezcla en los análisis de estructura (Fig. 8). Resultados similares fueron reportados para la población de Roncesvalles

(Tolima) y Cocora (Quindío) que se encuentran igualmente en la Cordillera Central (Sanín, 2013a). Tanto en las poblaciones evaluadas por Sanín como las dos poblaciones evaluadas en este trabajo (Toche y La Línea), los patrones de alta estructuración son notorias, a pesar de la cercanía geográfica entre las localidades.

#### **7.4 Relaciones de parentesco**

Los análisis de hermanos completos fueron comparados con los valores de la diversidad genética ( $H_e$ ). Las poblaciones con mayor porcentaje de hermanos completos (Milán y Jardín), presentaron valores de diversidad más bajos, mientras que en las poblaciones con un menor porcentaje de hermanos completos el valor de diversidad fue mayor (Fig. 7). Este resultado es de esperarse puesto que el manejo y selección del material en los diferentes viveros conllevan a la pérdida de diversidad y a una alta estructuración genética (Williams y Davis, 1996; Hollingsworth *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2008; Li-Y.Y. *et al.*, 2005; Yokogawa *et al.*, 2013).

A pesar de que el Jardín presenta un número de individuos alto, los bajos valores de  $H_e$  reflejan el hecho de que la mayoría de individuos tiene genotipos similares. Aunque en general en los viveros los valores de diversidad no son extremadamente bajos (inferiores a 0.4), los viveros (Jardín y Milán) sólo albergan una parte de la diversidad de la población silvestre de Cocora. En contraste, el vivero Roso presenta la mayor diversidad genética entre las colecciones evaluadas. Aunque el número de muestra no es tan grande como el de Jardín, el porcentaje de hermanos completos es menor, por lo cual se estima que la diversidad excede la de los otros viveros evaluados. Las estrategias de manejo que ha tenido este vivero pueden ser un ejemplo para el establecimiento de otros viveros de palma de cera.

## **7.5 Asociación por microsatélites**

Generalmente los microsatélites permiten asociaciones de individuos pertenecientes a una determinada región geográfica (Olsen y Schaal, 2001), lo cual facilita la agrupación de los individuos con cierto grado de relación. En este estudio, los resultados del ACM muestran una clara agrupación entre Cocora, Roso y Jardín (Fig. 12b). En el caso de Jardín, las agrupaciones son consistentes con lo encontrado en el DAPC y en los dendogramas de distancias, dando mayor peso a la relación entre el vivero y la población silvestre del Valle de Cocora, resaltando a su vez la marcada lejanía con las otras poblaciones silvestres (Toche y La Línea). Aunque en el ACM muestra cercanía de Roso a Cocora y el Jardín, en los análisis anteriores se evidencia una marcada estructura, lo que hace difícil su asignación a una población silvestre.

Por otro lado, en el caso de Milán, aunque se conoce a priori que los individuos provienen de Cocora, probablemente la distancia entre ambas obtenida en el ACM pueda deberse al tamaño pequeño de la muestra del vivero. El ACM también muestra que la diversidad genética es baja en los viveros en comparación con las poblaciones silvestres, Este es el caso de Milán, el vivero con diversidad más baja, (Fig. 12a).

## **7.6 Conservación de la diversidad genética en poblaciones *ex situ* y efectividad de la repoblación a partir de viveros**

La gran cantidad de alelos privados en Cocora sugiere dos puntos relevantes para la conservación genética de la especie tanto en colecciones *ex situ*, como para el enriquecimiento genético a partir del repoblamiento. En primer lugar, los viveros no están capturando toda la diversidad genética de la población silvestre. Por otro lado, los alelos privados encontrados en los viveros pueden ser evidencia de alelos que se han perdido en la población silvestre, dada los efectos de endogamia o deriva, o que en los estudios genéticos anteriores de la población silvestre, esta no ha sido cabalmente muestreada, amplificando la diferenciación entre viveros y silvestres (Honjo *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2015).

Una consideración importante para la planificación de colecciones *ex situ* es la estructura poblacional, dado que la subdivisión generada da lugar a alelos o rasgos restringidos localmente que tiene un valor ecológico y de conservación (Hoban y Schlarbaum, 2014). Sin embargo, los protocolos comunes para las colecciones *ex situ* no consideran la estructura poblacional, ni cómo afecta la probabilidad esperada de captura de alelos y los efectos del parentesco en la composición de las colecciones (Hoban y Schlarbaum, 2014). Cuando existe un amplio rango de estructura poblacional como es el caso de Cocora, Toche y La Línea, la distribución espacial de las poblaciones muestreadas es crucial, siendo mucho más eficientes los muestreos en zonas dispersas que abarcando muchos individuos en una región limitada. Sin embargo, si el material de los viveros va a ser usado en programas de repoblamiento, es necesario respetar la procedencia del material y garantizar que no se mezclen procedencias en el campo para evitar la contaminación genética.

En temas de restauración la contaminación genética hace referencia a la introducción de material genético inadaptado a las condiciones locales, por lo cual es un problema en la restauración especialmente para poblaciones pequeñas y aisladas (Huffor y Mazer, 2003; Rice y Emery, 2003). Por lo cual, es recomendable el uso de material local de fuentes como viveros o germinación *in situ* del cual se tenga referencia de la procedencia; pero para esto también es vital tener un buen conocimiento de la diversidad genética de las poblaciones (McKay *et al.*, 2005) Basados en los estudios Sanín *et al.*, (en prep.) las poblaciones de la Cordillera Central de *Ceroxylon quindiuense*, entre ellas la población de Cocora, albergan la mayor diversidad genética, sin embargo Cocora es la población más pequeña de palma y que esta inmersa entre matrices de potreros que la separan de otras poblaciones como Toche y Roncesvalles, por lo que a pesar de la gran diversidad que presenta actualmente, a medida que la población disminuye la probabilidad de endogamia aumenta mientras que la variación genética se pierde por deriva génica.

Sin embargo, un tema importante en la restauración de poblaciones es el balance entre evitar la endogamia mientras al mismo tiempo se previene la depresión por exogamia. Esta puede ser la carga introducida o contaminación genética resultante del cruce entre poblaciones adaptadas a diferentes ambientes (Mckay *et al.*, 2005). Por lo cual es importante resaltar que si el objetivo no es aumentar la diversidad genética, introducir genotipos que no sean locales puede llevar a una sobrerrepresentación de la diversidad lo que conduce a que incremente la proporción de genotipos no adaptados, resultantes de la mezcla génica después de la introducción del material no local (Menges, 2008), es decir, que la depresión exogámica lleva a que los cruces entre poblaciones ecológicamente divergentes puedan resultar en expresar fenotipos intermedios que no son favorecidos localmente (Mckay *et al.*, 2005) . A pesar de los grandes esfuerzos que se dediquen a la restauración, Ignorar la adaptación local podría impedir el éxito de la restauración y la viabilidad a largo plazo de las poblaciones (Templeton 1986).

La depresión por endogamia también puede resultar del rompimiento entre las asociaciones de los loci o el desequilibrio de ligamiento entre los alelos de diferentes loci (Fenster *et al.* 1997). Esto debido a que la expresión del fenotipo de un alelo en particular dependerá de los alelos de los otros loci (Whitlock *et al.*, 1995). Las interacciones de los loci en el genoma, por ejemplo en los casos de epístasis, que produce un fenotipo integrado funcional, lo que se conoce como complejo coadaptado de genes (Whitlock *et al.*, 1995). Aun si dos poblaciones son similares fenotípicamente y experimentan presiones de selección similares, cruces entre estas poblaciones puede producir híbridos no aptos dado el rompimiento del complejo de estos genes (Fenster y Galloway, 2000; Mckay *et al.*, 2005)

La conservación de la diversidad genética es de gran relevancia en temas de conservación (Mckay *et al.*, 2005) En el caso del Valle de Cocora, basado en las características genéticas y el conocimiento previo de la gran diversidad genética que allí se alberga (Sanín *et al.*, en prep.), la relevancia es la conservación del acervo genético actual que durante largo tiempo se ha adaptado a las condiciones de la zona. La concordancia encontrada entre los viveros del Jardín y Milán con el

perfil genético la población de Cocora es recomendable para usarlo como material en el proceso de repoblamiento. Igualmente es importante resaltar la necesidad de establecer y fortalecer viveros o bancos de semillas locales para utilizarlos como material de reintroducción, pero teniendo en cuenta el objetivo de dichas colecciones de reflejar la diversidad genética silvestre.

## 8. CONCLUSIONES

Los individuos pertenecientes a los viveros del Jardín y Milán son aptos para ser sembrados en el Valle de Cocora, ya que constituyen parte del acervo genético de la población silvestre de la zona. Sin embargo, a pesar de que el material de los viveros es compatible con el material de la población silvestre, este no recuperaría toda la diversidad genética encontrada en la población silvestre, por lo que es necesario hacer una mejor cobertura de ésta en las colecciones vivas a través del cultivo de semillas obtenidas de áreas en la Cordillera Central.

El objetivo de los viveros debe enfocarse en mantener la especie hasta poder reintegrar a los individuos a las poblaciones silvestres, dada la longevidad o largos ciclos de vida de *C. quindiuense*, el éxito de los viveros radica en el mantenimiento de la diversidad genética de la especie, para a largo plazo poder introducirlas. Es por ello que es fundamental que las poblaciones liberadas alberguen suficiente variabilidad genética para proporcionar flexibilidad de adaptación en un futuro incierto pero que esta variabilidad no sea muy diferente de la población silvestre para no llegar a alterar el acervo genético. Este objetivo no es inverosímil; los viveros hoy, aunque sin una estrategia de manejo adecuada, albergan una diversidad genética importante. Es sólo de esperarse que con las prácticas adecuadas de recolección de germoplasma y mantenimiento de las colecciones, esta diversidad aumente.

Las poblaciones silvestres de *C. quindiuense* de la Cordillera Central tienen una diversidad genética alta que permite aún el establecimiento de programas de

re poblamiento potencialmente exitosos. Estas poblaciones exhiben una estructuración genética importante, por lo que debe procurarse la conservación de cada unidad que representa un acervo genético independiente. Las colecciones vivas deben asumir la conservación de cada una de las poblaciones silvestres presentes hoy sobre la Ecorregión Eje Cafetero.

La presencia de muchos individuos que sean hermanos completos en los viveros ocasiona que no se abarque toda la diversidad de la población silvestre, ya que se está representando la misma información genética en los hermanos, esto evidenciado en la gran cantidad de alelos privados en la población silvestre del Valle de Cocora con respecto a los viveros Milán y Jardín. Por lo cual, el establecimiento de los viveros debe procurarse por co lectar individuos poco emparentados para abarcar la mayor virabilidad genética de las poblaciones silvestres.

## **9. IMPACTO ESPERADO**

Se pretende que los resultados de la presente tesis sobre la diversidad de los viveros de palma de cera (*C. quinduense*) sean utilizados para mejorar la eficacia de las estrategias de conservación planteadas, en cuanto la creación de viveros, buscando que estos contengan una diversidad genética representativa de las poblaciones silvestres, en este caso el Valle de Cocora. Además fortalecer las estrategias de conservación *in situ* para la recuperación de la especie en Cocora y garantizar la repoblación con material que contribuya al acervo genético natural.

De igual forma, darle importancia a la labor de reproducción y cuidado de la palma de cera adelantado por el Jardín y el reconocimiento a la labor de viveros no reconocidos como Milán y Roso, iniciativas de ciudadanos comunes preocupados por la conservación de la palma. Lo que aporta a la incursión de la comunidad en el cuidado de la especie y en la preservación de la misma en las poblaciones silvestres. Además, generar información que ayude a mejorar las estrategias de

conservación que podrían ser implementadas en los viveros, y las cuales podrían convertirse en una potencial herramienta económica y social incentivando y vinculando a la comunidad a la creación de viveros que apoyen los programas de conservación de palma.

## **10.RECOMENDACIONES**

Se sugiere establecer protocolos de siembra de esta especie en los viveros regionales. En estas colecciones, un aspecto fundamental debe ser el conocimiento de la procedencia y el método de extracción del material vegetal para sembrar. Así, debe optimizarse los protocolos para evitar no solamente la disminución del impacto sobre las poblaciones silvestres, sino la conservación de la diversidad genética en las colecciones vivas y el enriquecimiento genético que se hace en los programas de repoblamiento y regeneración de poblaciones silvestres.

Se recomienda que los programas de siembra incorporen el conocimiento que se tiene sobre la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *C. quindiuense* para que en las colecciones vivas se haga una cobertura efectiva de la diversidad genética que se presenta en las poblaciones naturales. En el momento las plántulas encontradas en los viveros tienen hermandad mayor que la encontrada en las poblaciones naturales, lo que sugiere que se están tomando al bulto semillas de una misma progenitora.

Se hace énfasis en la conservación *in situ* y en la reintroducción de los individuos de poblaciones *ex situ* a las poblaciones silvestres como herramienta de conservación (Miao *et al.*, 2015). Por lo tanto, a la hora de crear colecciones o viveros, los individuos con alelos en común deberían ser preservados en los viveros, dado que es imposible predecir cuales alelos se mantendrán o adaptaran a los cambios ambientales en el futuro y también para maximizar la representación genética de la población original (Namoff *et al.*, 2010; Miao *et al.*, 2015).



Por último, aunque el programa de repoblamiento y conservación del Árbol Nacional debe asumirse a nivel regional, los resultados de este trabajo refuerzan la recomendación de respetar el acervo genético a nivel local. Esto quiere decir que debe efectuarse un repoblamiento específico para cada población, con material extraído localmente. Si en una localidad ya se extinguieron localmente las palmas de cera, debe procurarse obtener el material de repoblamiento a partir de la población más cercana. También es importante que se haga un seguimiento de las poblaciones para monitorear la viabilidad de las mismas y que esto esté bajo la supervisión de los expertos en la especie, ya que sus experiencias y aportes en campo son vitales para la toma de decisiones acertadas para la conservación de la misma.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Aavik, T., Edwards, P. J., Holderegger, R., Graf, R., & Billeter, R. (2012). Genetic consequences of using seed mixtures in restoration: a case study of a wetland plant *Lychnis flos-cuculi*. *Biological Conservation*, *145*(1), 195-204.

Abbo, S., Berger, J., & Turner, N. C. (2003). Viewpoint: evolution of cultivated chickpea: four bottlenecks limit diversity and constrain adaptation. *Functional Plant Biology*, *30*(10), 1081-1087.

Abe, J., Xu, D., Suzuki, Y., Kanazawa, A., & Shimamoto, Y. (2003). Soybean germplasm pools in Asia revealed by nuclear SSRs. *Theoretical and Applied Genetics*, *106*(3), 445-453.

Alam, M. S., & Islam, M. S. (2005). Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, *246*(1), 151-160.

Allendorf, F. W., & Luikart, G. (2007). Conservation and the genetics of populations. *Mammalia*, *2007*, 189-197.

Anthelme, F., Lincango, J., Gully, C., Duarte, N., & Montúfar, R. (2011). How anthropogenic disturbances affect the resilience of a keystone palm tree in the threatened Andean cloud forest?. *Biological Conservation*, *144*(3), 1059-1067.

Aranguren-Méndez, J. A., Román-Bravo, R., Isea, W., Villasmil, Y., & Jordana, J. (2005). Los microsatélites (STR´ s), marcadores moleculares de ADN por

excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review).

Asmussen-Lange, C.B., Maunder, M., & Fay, M. F. (2011). Conservation genetics of the critically endangered Round Island bottle palm, *Hyophorbe lagenicaulis* (Arecaceae): can cultivated stocks supplement a residual wild population?. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 167(3), 301-310.

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

Baker, C. P. (2012). *National Geographic Traveler Colombia*. National Geographic Books. 320 p.

Baker, W.J. & T.L.P. Couvreur. (2013). Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. I. Historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 40, 274–285.

Beheregaray, L. B., & Sunnucks, P. (2001). Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. *Molecular Ecology*, 10(12), 2849-2866.

Bernal, R., & Sanín, M. J. (2013). Los palmares de *Ceroxylon quindiuense* (Arecaceae) en el Valle de Cocora, Quindío: perspectivas de un ícono escénico de Colombia. *Colombia Florestal*, 16(1), 67-79.

Blouin, M. S., Parsons, M., Lacaille, V., & Lotz, S. (1996). Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5(3), 393-401.

Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(10), 503-511.

Borchsenius, F. & Skov, F. (1999). Conservation status of palms (Arecaceae) in Ecuador. *Acta Botánica Venezolánica* 22: 221–236.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., & Davis, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American journal of human genetics*, 32(3), 314.

Burgarella, C., Lorenzo, Z., Jabbour-Zahab, R., Lumaret, R., Guichoux, E., Petit, R. J. & Gil, L. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Heredity*, 102(5), 442-452.

Carder. 2002. Ecorregión eje cafetero: un territorio de oportunidades. Pereira: Carder. Recuperado de [http://www.Lotero-Echeverri et al., 2006.Imamater.edu.co/Publicaciones/Ecorregion\\_Eje\\_Cafetero\\_Un\\_Territorio\\_de\\_Oportunidades.pdf](http://www.Lotero-Echeverri_et_al.,_2006.Imamater.edu.co/Publicaciones/Ecorregion_Eje_Cafetero_Un_Territorio_de_Oportunidades.pdf) (consultado el 8 febrero del 2015)

Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., & Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica*, 142(1-2), 169-196.

Connell, J. P., Pammi, S., Iqbal, M. J., Huizinga, T., & Reddy, A. S. (1998). A high through-put procedure for capturing microsatellites from complex plant genomes. *Plant Molecular Biology Reporter*, 16(4), 341-349.

Courchamp, F., Berec, L., & Gascoigne, J. (2008). Allee effects in ecology and conservation. *Environmental Conservation*, 36, 80-85.

Debinski, D.M., & Holt, R.D. (2000). A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conservation biology*, 14(2), 342-355.

Dolan, R. W., Marr, D. L., & Schnabel, A. (2008). Capturing genetic variation during ecological restorations: An example from Kankakee Sands in Indiana. *Restoration Ecology*, 16(3), 386-396.

Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: Evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16, 463-475.

El-Lakany, M.H. (2004). Are genetically modified trees a threat to forests? *Unasyva*, 55(217), 45-47.

Enßlin, A., Sandner, T.M., & Matthies, D. (2011). Consequences of ex situ cultivation of plants: genetic diversity, fitness and adaptation of the monocarpic *Cynoglossum officinale* L. in botanic gardens. *Biological Conservation*, 144(1), 272-278.

Etisham-Ul-Haq, M., Allnutt, T.R., Smith-Ramirez, C., Gardner, M.F., Armesto, J. J., & Newton, A.C. (2001). Patterns of genetic variation in in and ex situ populations of the threatened Chilean Vine *Berberidopsis corallina*, detected using RAPD markers. *Annals of Botany*, 87(6), 813-821.

Epsater, A. (2012). Colombia handbook. Footprint, Bath, Reino Unido. 405 p.

- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 487-515.
- Fenster, C. B., Galloway, L. F. & Chao, L. (1997). Epistasis and its consequences for the evolution of natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 12,282–286.
- Fenster, C. B., & Galloway, L. F. (2000). Population differentiation in an annual legume: genetic architecture. *Evolution* 54,1157–1172.
- Ferreira, M.E., & Grattapaglia, D. (1998). Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Embrapa.
- Flórez, J. E. M., Coronado, A. C. M., & Coronado, Y. M. (2008). Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. *Acta Agronómica*, 57(4), 219-226.
- Frankham, R., Ballou, J.D., & Briscoe, D.A. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- Gaitán, E. (2003). Obtención y uso de secuencias microsatélites GA/CA en estudios de diversidad genética en las especies de palmas colombianas *Ceroxylon sasaimae*, *Ceroxylon alpinum* y *Attalea amygdalina*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Colombia.
- Galeano, G. y Bernal, R. (2005). Palmas. Págs. 59-224. In: Calderón E, Galeano G, García N, editors. Libro Rojo de las Plantas de Colombia. Volumen 2: Palmas, Frailejones y Zamias. Serie de Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 59-224. Galeano, G. 1995. Novedades en el género *Ceroxylon* (Palmae). *Caldasia* 17: 395-408.
- Galeano, G., Sanín, M.J., Mejía, K., Pintaud, J. C., & Millán, B. (2008). Novedades en el género *Ceroxylon* (Arecaceae) del Perú, con la descripción de una nueva especie. *Revista Peruana de Biología*, 15, 65-72.
- Galeano, G., Bernal, R. & Sanín, M.J. (2015). Plan de Conservación y uso Sostenible de la Palma de Cera del Quindío (*Ceroxylon quindiuense*) Árbol Nacional de Colombia. Universidad Nacional de Colombia y Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible.

Galvis-Ruiz, M.Y. (2006). Plan básico de manejo 2006-2010 Parque Nacional Natural Los Nevados. Medellín: Parques Nacionales Naturales de Colombia Dirección Territorial Noroccidente. 202 p.

Gerlach, G., Jueterbock, A., Kraemer, P., Deppermann, J. & Harmand, P (2010) Calculations of population differentiation based on GST and D: forget GST but not all of statistics! *Molecular Ecology*, 19, 3845–3852.

Girón-Vanderhuck, M., Salazar, G.E., Agudelo, F.D. (2001). Estructura poblacional de la palma de cera *Ceroxylon quindiuense* (Karst.) H. Wendl. en Toche, Tolima. In: Girón-Vanderhuck, M (ed.), *Bosques de Palma de Cera. Universidad del Quindío*, pp. 31–41.

Godefroid, S., Piazza, C., Rossi, G., Buord, S., Stevens, A. D., Aguraiuja, R., Cowell, C., Weekley, C., Vogg, G., Iriondo, J., Jhonson, I., Dixon, B., Gordon, D., Magnannon, S., Valentin, B., Bjureke, K., Kopman, R., Vicens, M., Virevaire, M., & Vanderborght, T. (2011). How successful are plant species reintroductions?. *Biological Conservation*, 144(2), 672-682.

Goldstein, D.B., & Schlotterer, C. (1999). Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, Oxford, UK.

González-Rodríguez, V., Barrio, I.C., Villar, R., & Navarro-Cerrillo, R. (2013, June). Regeneración de los bosques de Quercus. El papel de la diversidad intraespecífica. In *Congresos Forestales*.

Goodnight, K. F., & Queller, D. C. (1998). Relatedness 5.0. 8. *Goodnight Software. Houston, TX. See <http://www.gsoftnet.us/GSoft.html>*.

Guo, S.W., & Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics*, 361-372.

Guo J, Wang Y, Song C, Zhou J, Qiu L, Huang H, Wang &. (2010). A single origin and moderate bottleneck during domestication of soybean (*Glycine max*): implications from microsatellites and nucleotide sequences. *Annals of Botany* 106, 505–514

Hamrick, J. L. (2004). Response of forest trees to global environmental changes. *Forest ecology and management*, 197(1), 323-335.

Havens, K., Vitt, P., Maunder, M., Guerrant, E.O., & Dixon, K., (2006). *Ex situ* plant conservation and beyond. *BioScience* 56, 525–531.

Helgen, K., & Parsons, L.S. (1997). Genetic Variation and the Reproduction of *Cordylanthus maritimus* ssp. *maritimus* to Sweetwater Marsh, California. *Restoration Ecology*, 5(3), 236-244.

Henderson, A., Galeano, G. & Bernal, R. (1995). Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton, 352 pp.

Herbers, J. M., & Mouser, R. L. (1998). Microsatellite DNA markers reveal details of social structure in forest ants. *Molecular Ecology*, 7(3), 299-306.

Hoban, S., & Schlarbaum, S. (2014). Optimal sampling of seeds from plant populations for ex-situ conservation of genetic biodiversity, considering realistic population structure. *Biological Conservation*, 177, 90-99.

Hollingsworth, P.M., Dawson, I.K., Goodall-Copestake, P., Richardson, J.E., Weber, J.C., Sotelo Montes, C., & Pennington, R.T. (2005). SHORT COMMUNICATION: Do farmers reduce genetic diversity when they domesticate tropical trees? A case study from Amazonia. *Molecular Ecology*, 14(2), 497-501.

Honjo, M., Ueno, S., Tsumura, Y., Handa, T., Washitani, I., & Ohsawa, R. (2008). Tracing the origins of stocks of the endangered species *Primula sieboldii* using nuclear microsatellites and chloroplast DNA. *Conservation Genetics*, 9(5), 1139-1147.

Hufford, K. M., & Mazer, S. J. (2003). Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends in Ecology and Evolution* 18, 147–155.

IUCN 1987. Translocation of living organisms. IUCN Position Statement.

Jiménez, P., & Collada, C. (2008). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. *Forest Systems*, 9(4), 237-248.

Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC genetics*, 11(1), 94.

Jones, N., Ougham, H., & Thomas, H. (1997). Markers and mapping: we are all geneticists now. *New Phytologist*, 137(1), 165-177.

Jost, L. O. U. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, 17(18), 4015-4026.

Jost, L. O. U. (2009). D vs. GST: response to Heller and Siegismund (2009) and Ryman and Leimar (2009). *Molecular Ecology*, 18(10), 2088-2091.

Jueterbock, A., Kraemer, P., Gerlach, G., Deppermann, J., & Jueterbock, M. A. (2012). Package 'DEMEtics'. *Molecular Ecology*, 19, 3845-3852.

Knutsen, H., Jorde, P.E., André, C., & Stenseth, N. C. H. R. (2003). Fine-scaled geographical population structuring in a highly mobile marine species: the Atlantic cod. *Molecular ecology*, 12(2), 385-394.

Kosman, E., & Leonard, K. J. (2005). Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular ecology*, 14(2), 415-424.

Kraemer, P., & Gerlach, G. (2013). Package 'Demerelate'. R software.

Krauss, S.L., Dixon, B., & Dixon, W. (2002) Rapid genetic decline in a translocated population of the endangered plant *Grevillea scapigera*. *Conservation Biology* 16, 986–994. doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.01105.x

Kumar, P., Gupta, V.K., Mirsra, A.K., Modi, D.R., & Pandey, B.K. (2009). Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics* 2 (4), 141-162.

Leimu, R., Mutikainen, P. I. A., Koricheva, J., & Fischer, M. (2006). How general are positive relationships between plant population size, fitness and genetic variation? *Journal of Ecology*, 94(5), 942-952.

Li, Q., He, T., & Xu, Z. (2005). Genetic evaluation of the efficacy of in situ and ex situ conservation of *Parashorea chinensis* (Dipterocarpaceae) in southwestern China. *Biochemical genetics*, 43(7-8), 387-406.

Li, Y.Y., Chen, Y.X., Zhang, X., Wu, T.Y., Ping, L.U.H, & Cai, Y.W. (2005). Genetic differences between wild and artificial populations of *Metasequoia glyptostroboides*: implications for species recovery. *Conservation Biology*, 19(1), 224-231.

Liu, M. H., Chen, X. Y., Zhang, X., & Shen, D. W. (2008). A population genetic evaluation of ecological restoration with the case study on *Cyclobalanopsis myrsinaefolia* (Fagaceae). *Plant Ecology*, 197(1), 31-41.

Lotero-Echeverri, J.H., Dossman-Gil, M.A., Castillo-Ríos, C.J., Giraldo-Rojas, M.E., Fernández-Cruz, G.G., Echeverry-Norman, G.E., Arias-Fierro, M.H., Montoya-Arias, E.J., Barrero-Pizarro, J.C., Cardona-Carvajal, N., Ramírez, C.E., Cruz-González, G., Tafur-Arango, O., Ramírez-Jaramillo, J.C., Cardona-Ávila, A.,

Medellín-Cardona, A., A., & Galvis Ruiz, M.Y. (2006). Plan básico de manejo 2006-2010 Parque Nacional Natural Los Nevados. Medellín: Parques Nacionales Naturales de Colombia Dirección Territorial Noroccidente. 202 p.

Luijten, S.H., Kéry, M., Oostermeijer, J.G.B., den Nijs, H.C.M., 2002. Demographic consequences of inbreeding and outbreeding in *Arnica montana*: a field experiment. *Journal of Ecology* 90, 593–603.

Madriñan, S., & Schultes, R.E. (1995). Colombia national tree: the wax palm *Ceroxylon quindiuense* and its relative. *Elaeis* 7, 35-56.

Manly, B.F. (2006). Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology (Vol. 70). CRC Press.

Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., & Pemberton, J.M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.

McGarigal, K. & Cushman, S. (2002); Comparative evaluation of experimental approaches to the study of habitat fragmentation effects. *Ecological Applications*, 12(2), 335–345

McKay, J.K., Christian, C.E., Harrison, S., Rice, K.J., 2005. How local is local? – A review of practical and conceptual issues in the genetics of restoration. *Restoration Ecology* 13, 432–440.

McNaughton, S.J., (1989). Ecosystems and conservation in the twenty-first century. In: Western, D., Pearl, M. (Eds.), *Conservation for the Twenty-first Century*. Oxford University Press, New York, pp. 109–120.

Meirmans, P. G., & Hedrick, P. W. (2011). Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 5-18.

Menges, Eric S. TURNER REVIEW No. 16. Restoration demography and genetics of plants: when is a translocation successful? *Australian Journal of Botany*, 2008, vol. 56, no 3, p. 187-196.

Miao, Y.C., Su, R.J., Zhang, Z.J., Lang, X.D., Liu, W.D. & Li, S.F. (2015). Microsatellite markers indicate genetic differences between cultivated and natural populations of endangered *Taxus yunnanensis*. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 177, 450–461.

Michelin. (2011). The green guide-Colombia. Michelin, Greenville, SC, USA. 437 p.



Miller, A. J., & Schaal, B. A. (2006). Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree *Spondias purpurea* L.(Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, 15(6), 1467-1480.

Moore, H.E. Jr, & Anderson, A.B. (1976). *Ceroxylon alpinum* and *Ceroxylon quindiuense* (Palmae). *Gentes Herbarum*, 11, 168-185

Morgante, M., Hanafey, H., & Powell, W. (2002). Microsatellites are preferentially associated with nonrepetitive DNA in plant genome. *Nature Genetics*. 30:194–200.

Musoli, P, Cubry P, Aluka P, Billot C, Dufour M, De Bellis F, Pot D, Bieysse D, Pérez De La Torre, M., Soto, M. S., & Zelener, N. (2005). Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsatélites anclados. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*.

Musoli, P., Cubry, P., Aluka, P., Billot, C., Dufour, M., De Bellis, F., Pot, D., Bieysse, D., Charrier, A. & Leroy, T. (2009). Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome*, 52(7), 634-646.

Nagy, S., Poczai, P., Cernák, I., Gorji, A. M., Hegedűs, G., & Taller, J.(2012). PICcalc: an online program to calculate polymorphic information content for molecular genetic studies. *Biochemical genetics*, 50(9-10), 670-672.

Namoff, S., Husby, C. E., Francisco-Ortega, J., Noblick, L. R., Lewis, C. E., & Griffith, M. P. (2010). How well does a botanical garden collection of a rare palm capture the genetic variation in a wild population? *Biological Conservation*, 143(5), 1110-1117.

Nason, J.D. & Hamrick, J.L. (1997). Reproductive and Genetic Consequences of Forest Fragmentation: Two Case Studies of Neotropical Canopy Trees. *Journal of Heredity*. 8,264-276

Nei, M., & Feldman, M. W. (1972). Identity of genes by descent within and between populations under mutation and migration pressures. *Theoretical population biology*, 3(4), 460-465.

Nei M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70, 3321-3.

Olsen, K. M., & Schaal, B. A. (2001). Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany*, 88(1), 131-142.

Palomino-Ortiz, G. (1991). La Palma de Cera (*Ceroxylon quindiuense*) *Revista Universitaria del Tolima Ciencia y Tecnología*. 5, 167-183

Pavlik, B.M., 1996. Defining and measuring success. In: Falk, D.A., Millar, C.I., Olwell, M. (Eds.), *Restoring Diversity: Strategies for the Reintroduction of Endangered Plants*. Island Press, Washington, DC, pp. 127–155.

Pérez De La Torre, M., Soto, M. S., & Zelener, N. (2005). Identificación de clones selectos de *Nierembergia linariaefolia* mediante microsátélites anclados. *Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*.

Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.

Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J.M., (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*. 90, 502–503.

Powell, W., Machray, G.C., & Provan, J. (1996). Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in plant science*, 1(7), 215-222.

R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. <http://www.R-project.org> [accessed 27 March 2015]

Raub, K., Egerton, A., & Power, M. (2012). Colombia. Melbourne: Lonely Planet Publications. 342 p.

Raymond, M., & Rousset, F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3), 248-249.

Rice, K. J., & Emery, N. C. (2003). Managing microevolution: restoration in the face of global change. *Frontiers in Ecology and the Environment* 9,469–478.

Ricketts, T. H., Dinerstein, E., Boucher, T., Brooks, T. M., Butchart, S. H., Hoffmann, M., Lamoreux, J., Morrison, J., Parr, M., Pilgrim, J., Rodrigues, A., Sechrest, W., Wallace, G., Berlin, K., Bielby, J., Burgess, N., Church, D., Cox, N., Knox, D., Loucks, C., Luck, G., Master, L., Moore, R., Naidoo, R., Ridgely, R., Schatz, G., Shire, G., Strand, H., Wettengel, W., & Wikramanayake, E. (2005). Pinpointing and preventing imminent extinctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(51), 18497-18501.

Rousset, F (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1), 103-106.

Roques, S., Duchesne, P., & Bernatchez, L (1999). Potential of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case study. *Molecular Ecology*, 8(10), 1703-1717.

RobichauxRH, Friar EA, MountDW(1997) Molecular genetic consequences of a population bottleneck associated with reintroduction of the Mauna Kea silversword (*Argyroxiphium sandwicense* ssp. *Sandwicense* [Asteraceae]). *Conservation Biology*, 11, 1140–1146. doi: 10.1046/j.1523-1739.1997.96314.x.

Ruber, L., Meyer, A., Sturmbauer, C. & Verheyen, E., (2001). Population structure in two sympatric species of the Lake Tanganyika cichlid tribe Eretmodini: evidence for introgression. *Molecular Ecology*, 10, 1207-1225.

Sánchez-Vilas, J., Retuerto, R., (2007). *Quercus ilex* shows significant among-population variability in functional and growth traits but maintains invariant scaling relations in biomass allocation. *International Journal of Plant Science* 168, 973–983.

Sanín, M.J., & Galeano, G. (2011). A revisión of the Andean wax palms, *Ceroxylon* (Arecaceae). *Phytotaxa*, 34, 1-64.

Sanín, M.J. (2013a). Estudios ecológicos y evolutivos en ceroxylon (palmae: ceroxylloideae) Tesis de Doctorado, *Universidad Nacional de Colombia*.

Sanín, M.J. (2013b). La palma de cera del Quindío (*Ceroxylon quindiuense*). Pp. 159-164. n: Bernal, R. y G. Galeano (Eds.) Cosechar sin destruir – Aprovechamiento sostenible de palmas colombianas. Facultad de Ciencias-Instituto de Ciencias Naturales, *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá. 244 pp.

Sanín, M.J., Anthelme, F., Pintaud, J.C., Galeano, G., Bernal, R. (2013) Juvenile Resilience and Adult Longevity Explain Residual Populations of the Andean Wax Palm *Ceroxylon quindiuense* after Deforestation. *PLoS ONE* 8(10): e74139

Sanín, M.J, Zapata, P., Pintaud, J.C., Galeano, G, Tohme, J., Bohórquez, A. y Hansen, M.M (en prep.) Up and down the blind alley: population divergence with scant gene flow in a tropical lineage of Andean palms (*Ceroxylon quindiuense* clade: Ceroxylloideae). Sometido a: *Diversity and Distributions*.

Sanín, M.J. & Anthelme, F. In press. Ecological status of a population of an endangered palm species from the Sierra Nevada de Santa Marta (Colombia). *Caldasia* Accepted in March 2013.

Saunders, D. A., Hobbs, R. J., & Margules, C. R. (1991). Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation biology*, 5(1), 18-32.

Simko, I. (2009). Development of EST-SSR markers for the study of population structure in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Journal of Heredity*, 100(2), 256-262.

Steneck, R. S., Graham, M. H., Bourque, B. J., Corbett, D., Erlandson, J. M., Estes, J. A., & Tegner, M. J. (2002). Kelp forest ecosystems: biodiversity, stability, resilience and future. *Environmental conservation*, 29(04), 436-459.

Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S. (2007) Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity*, 98, 128–142.

Storfer, A., Murphy, M. A., Spear, S. F., Holderegger, R., & Waits, L. P. (2010). Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*, 19(17), 3496-3514.

Struss, D., & Plieske, J. (1998). The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 97(1-2), 308-315.

Tanksley, S. D., & McCouch, S. R (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science*, 277(5329), 1063-1066.

Templeton, A. R. (1986). Coadaptation and outbreeding depression. Pages 105–116 in M. Soule, editor. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.

Thompson, K., Bakker, J., Bekker, R., 1997. *The Soil Seed Bank of North West Europe: Methodology, Density and Longevity*. Cambridge University Press, Cambridge.

Thuiller, W., (2007). Biodiversity: climate change and the ecologist. *Nature* 448, 550–552.

Tóth, G., Gáspari, Z., Jurka, J. (2000). Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research* 10:967-981.

Trénel, P., Gustafsson, M.H.G., Baker, W.J., Asmussen-Lange, C.B., Dransfield, J. & Borchsenius, F. (2007). Mid-Tertiary dispersal, not gondwanan vicariance explains distribution patterns in the wax palm subfamily (Ceroxyloideae: Arecaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 272–288.

Udupa, S.M., Robertson, L.D., Weigand, F., Baum, M., Kahl, G. (1999). Allelic variation at (TAA)<sub>n</sub> microsatellite loci in a world collection of chickpea (*Cicer arietinum* L.) germplasm. *Molecular Gen Genetics* 261:354-363.

UNESCO. (2011). paisajeculturalcafetero.org.co (consultado el marzo 2014)

Van Groenendael, J.M., Ouborg, N.J., Hendriks, R.J.J., 1998. Criteria for the introduction of plant species. *Acta Botanica Neerlandica* 47, 3–13.

Vander Mijnsbrugge, K., Bischoff, A., Smith, B., (2010). A question of origin, Where and how to collect seed for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* 11, 300-311.

Varshney, R. K., Graner, A., & Sorrells, M. E. (2005). Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS in Biotechnology*, 23(1), 48-55.

Vergara-Chaparro, L.K. (2002). Demografía de *Ceroxylon alpinum* en bosques relictuales del Valle de Cocora, Salento, Quindío. Thesis, Departamento de Biología, *Universidad Nacional de Colombia*, Bogotá. 90 p. (available at: <http://www.bdigital.unal.edu.co>)

Vitt, P., y Havens, K., (2004). Integrating quantitative genetics into ex situ conservation and restoration practices. In: Guerrant, E.O., Havens, K., Maunder, M. (Eds.), *Ex situ Plant Conservation: Supporting Species Survival in the Wild*. Island Press, Washington, pp. 286–304.

Weir, B.S., & Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 1358-1370.

Weeks, A. R., Sgro, C. M., Young, A. G., Frankham, R., Mitchell, N. J., Miller, K. A., Byrne, M., Coates, D.J., Eldridge, M.D.B., Sunnucks, P., Breed, M.F., James, E.A. & Hoffmann, A. A. (2011). Assessing the benefits and risks of translocations in changing environments: a genetic perspective. *Evolutionary Applications*, 4(6), 709-725.

Williams, S. L., & Davis, C. A. (1996). Population genetic analyses of transplanted eelgrass (*Zostera marina*) beds reveal reduced genetic diversity in southern California. *Restoration Ecology*, 4(2), 163-180.

Whitlock, M. C., Phillips, P. C., Moore, F. B. & Tonsor, S. J. (1995). Multiple fitness peaks and epistasis. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26,601–629.

Whittaker, R. J., & Fernández-Palacios, J. M. (2007). *Island biogeography: ecology, evolution, and conservation*. Oxford University Press.

Woods, S. (2008). Colombia. Bradt Travel Guides, Chalfont St Peter, Reino Unido. 454 p.

Worthington- Wilmer, J., Allen, O.J., Pomeroy, P.P., Twiss, S.D. & Amos, W. (1999). Where have all the fathers gone? An extensive microsatellite analysis of paternity in grey seal (*Halichoerus grypus*). *Molecular Ecology*. 8, 1417-1430.

Yokogawa, M., Kaneko, S., Takahashi, Y., & Isagi, Y. (2013). Genetic consequences of rapid population decline and restoration of the critically endangered herb *Polemonium kiusianum*. *Biological Conservation*, 157, 401-408.

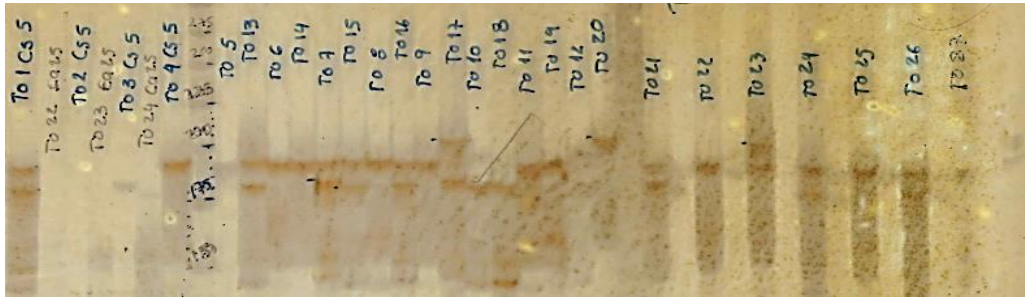
Young, A., Boyle, T., & Brown, T. (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 413-418.

## 12. ANEXO

### 11.1 Datos microsatélites y geles

Tabla A1. Cebadores usados para los análisis, secuencia y temperatura de hibridación de los 10 microsatélites.

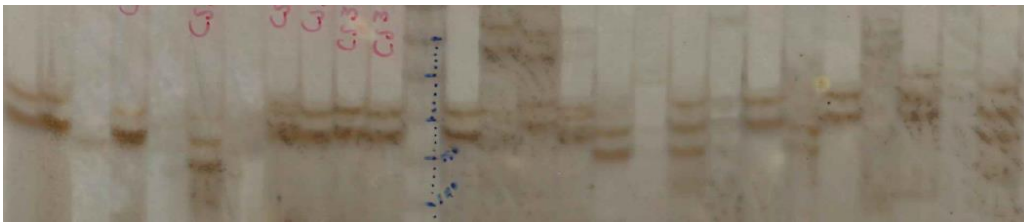
Locus	Primer L 5` - 3`	Primer R 5` - 3`	Motivo	AT (°C)
<b>Ca07</b>	TCTCCACCACTTGTTGACCA	CAAGGTCCAATGAAGGCTGC	(CT) <sub>15</sub> (CA) <sub>17</sub>	48
<b>Ca16</b>	TTGTAGACTCACGTCCAGTT	TGACAACCTCCTCACTCTTT	(TC) <sub>11</sub> (CA) <sub>8</sub>	48
<b>Ca17</b>	CAGACATTGGCTTCAAACA	ATGCGCTTATTTCTGTTCTC	(GA) <sub>30</sub>	48
<b>Ca20</b>	GTATTCCAAGCCCATTTC	CAGAGAGATAGAAAACCAAAGC	(GA) <sub>20</sub> (GA) <sub>29</sub>	48
<b>Ca25</b>	AATTCATACGTGCGCCCTGAG	CCGCCGTGACTCTCCTTAGC	(GA) <sub>25</sub>	50
<b>Ca30</b>	TCCCAGTCAGAGAATACATC	CTTGTTCTACCTGCCATG	(GT) <sub>10</sub> (GT) <sub>14</sub>	48
<b>Cs03</b>	GAATGTGACCATCTGCTA	AAATGTAGAGGAATTGCAT	(AC) <sub>13</sub> (GA) <sub>32</sub>	50
<b>Cs05</b>	GCATTGTGAGAGCAAGTGC	GAAACCACCAATCCTCCTTT	(TG) <sub>6</sub> (GT) <sub>9</sub>	50
<b>Cs24</b>	CGTGTCTTACCAGAGTGTCG	ACCGTCGTTTCATGGCACCA	(CA) <sub>20</sub> (GA) <sub>5</sub>	50
<b>Cs30</b>	GTGCGCCACATGGAAGCTTAA	CGAAGCCATCTGCATGGA	(GA) <sub>15</sub>	50



**Figura A1.** Gel de poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs5. Población Toche. Marcado de tamaño 25pb.



**Figura A2.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca25. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb.

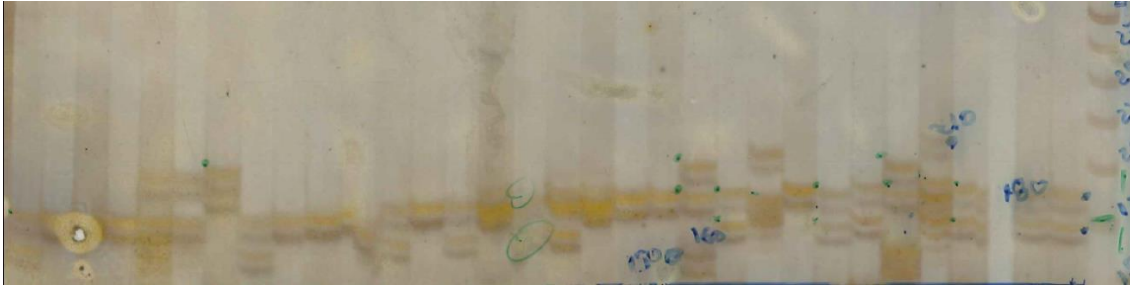


**Figura A3.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs30. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb.

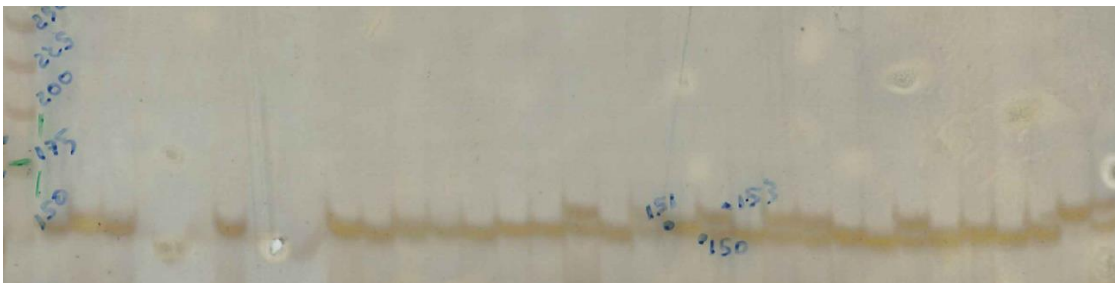


**Figura A4.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca16. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb.

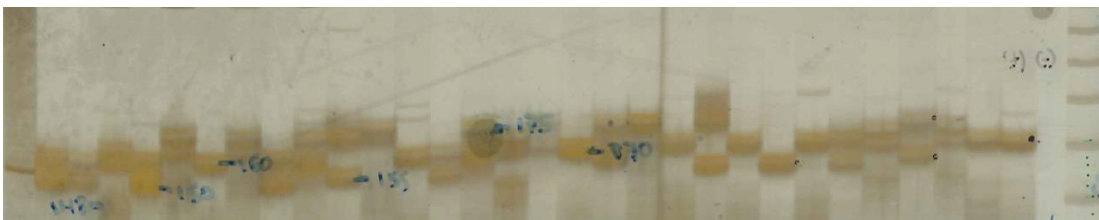




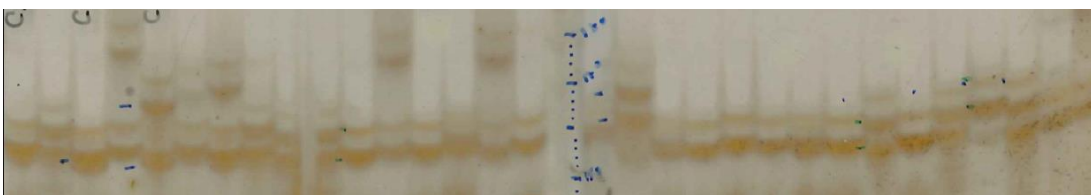
**Figura A5.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs24. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb.



**Figura A6.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca16. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb.



**Figura A7.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs3. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb.

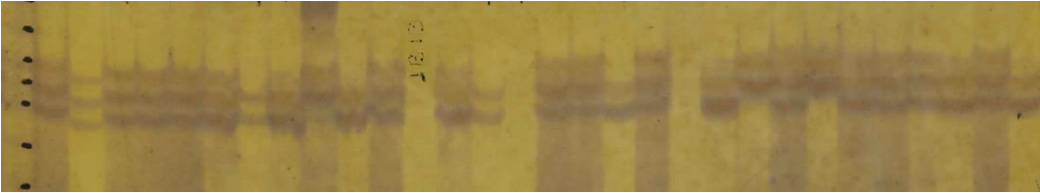


**Figura A8.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs30. Población la Línea. Marcador de tamaño 25pb.





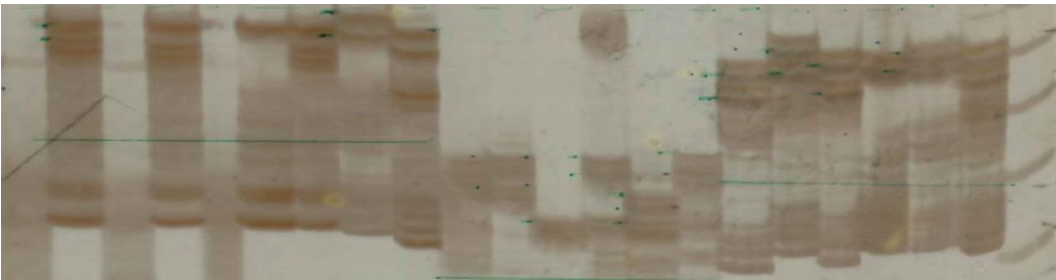
**Figura A9.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs5. Vivero Jardín. Marcador de tamaño 25pb.



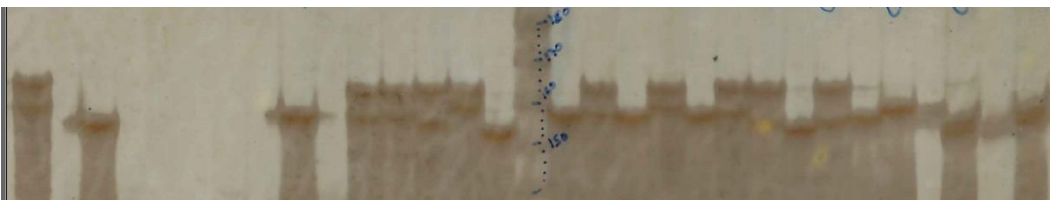
**Figura A10.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs30. Vivero Jardín. Marcador de tamaño 25pb.



**Figura A11.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca7. Vivero Roso. Marcador de tamaño 25pb.



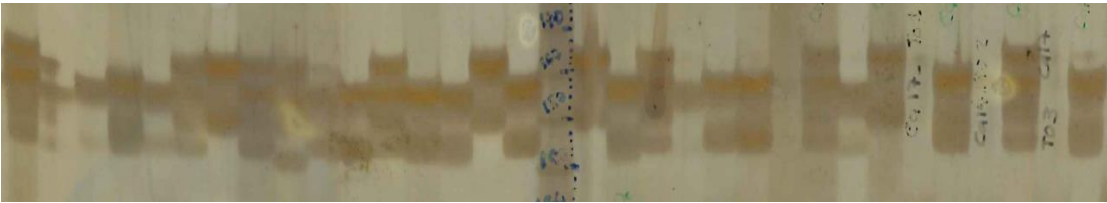
**Figura A12.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs5, Ca20, Cs3 (izquierda a derecha). Población La Línea. Marcador de tamaño 25pb.



**Figura A13.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca16. Vivero Roso. Marcador de tamaño 10pb.



**Figura A14.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca16. Vivero Jardín. Marcador de tamaño 10pb.



**Figura A15.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Ca16. Población Toche. Marcador de tamaño 10pb.



**Figura A16.** Gel poliacrilamida al 4% con producto amplificado para el microsatélite Cs5. Población Toche. Marcador de tamaño 10pb.

## 11.2 Participación en eventos académicos

EL trabajo de tesis fue sometido al Congreso Mundial de Palma 2015 que se realizará del 22 al 27 de Junio en Montenegro Quindío. (<http://palms2015.au.dk/>)

### **Effectiveness of nurseries collections to preserve genetic diversity of wild populations**

**Chacón- Vargas, K.<sup>1</sup>**, García-Merchán, V. H.<sup>1</sup>, Sanín-Perez, M.J.<sup>2</sup>

1. Universidad del Quindío, Grupo de Ecología, Genética y Evolución (GEGEUQ). Armenia. Colombia.

2. Universidad CES. Medellín. Colombia. [mjsanin@gmail.com](mailto:mjsanin@gmail.com)

Corresponding Author email: kchaconv@uqvirtual.edu.co

The wax palm, *Ceroxylon quindiuense* is the National Tree of Colombia; its characteristic key species within the Central Andes make it an ideal model species for conservation. For its economic, ecological, cultural and social importance, grows the need to establish best management strategies that focus on the persistence of the species. One of this Strategies is promote living plant collection which are important components of conservation because they preserve genetic diversity needed for future breeding and restoration programs. Critical conservation of collections with population genetics analysis can directly inform ex situ conservation strategy We evaluated efficiency of capturing genetic diversity of three nurseries from Botanical Garden of Calarca, Salento and Circasia using 10 microsatellite markers and compared them with a population from Cocora. Mean diversity ( $H_e$ ) differed little between collections (0,627) and the wild population (0,698), and genetic distances ( $D$ ) was great (0,245). Finally loss percent of alleles was determinated evaluating the probability of one nursering fail to include one allele from the wild population. Understanding the dynamics of ex situ collections is an important issue for the preservation of wild populatios in order to rescue the genetic variability in relation of a given área.

Key words:

*Ceroxylon quindiuense*, Ex situ conservation, Living collection, Microsatellites, Wax palm

### **11.3 Socialización del trabajo: Informe para la Corporación autónoma CRQ**

Informes y recomendaciones para el inicio del proyecto de repoblamiento de la zona alta del Valle de Cocora, Salento. El informe final se realizó en el formato adecuado según las recomendaciones de la Corporación autónoma Regional del Quindío CRQ.

### **INFORME DE ACTIVIDADES FINAL**

CONTRATO N°: 315 DE FECHA: ENERO 21 DE 2014

Objeto: Prestar servicios profesionales a la cooperación apoyando actividades del Programa 2 – Biodiversidad y sus servicios ecosistémicos y su Proyecto 9 – Conociendo para amar nuestra biodiversidad de la Corporación Autónoma Regional del Quindío – C.R.Q. realizando la caracterización genética de un

número significativo de palmas del Jardín Botánico del Quindío, para confirmar la procedencia del material con el fin de establecer si este puede ser sembrado en el Valle de Cocora dándole inicio al programa de repoblamiento.

## **ACTIVIDADES PACTADAS DENTRO DEL CONTRATO**

ACTIVIDAD No 1. Técnicamente la toma de muestras de las especies en proceso de identificación en campo.

ACTIVIDAD No 2. Realizar las labores de extracción de ADN de 60 individuos de palma, ampliación de los loci microsátélites, visualización y lectura de resultados, y análisis de datos.

ACTIVIDAD No3. Apoyar al grupo interno de profesionales de la C.R.Q. en la elaboración de reportes e informes necesarios tanto para los actores internos como externos.

<b>ACTIVIDAD</b>	<b>Mes 1</b>	<b>Mes 2</b>	<b>Mes 3</b>	<b>Mes 4</b>	<b>Mes 5</b>	<b>Mes 6</b>
Revisión Bibliográfica	x	X	X	x	x	
Colecta del material vegetal	X					
Extracción de ADN de 30 individuos	X					
Amplificación de los loci microsátélites		X				
Visualización y lectura de resultados		X	X			
Análisis de los datos				x		
Elaboración del documento				x	X	
Establecimiento de viabilidad				x	X	
Redacción del informe para remitir a la CRQ				x	X	

Revisión						X
Presentación de la Investigación						X

## REPORTE DE ACTIVIDADES

Se hizo una identificación de la especie por características morfológicas y se recolectó tejido de una pina de la hoja para hacer la extracción de ADN de los individuos del Jardín Botánico del Quindío.

### Extracción ADN

Toda la fase de laboratorio (contando con la infraestructura física y equipos) se realizó en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y el Laboratorio de Biología Molecular y Banco de Tejidos del Instituto Alexander von Humboldt, ambos ubicados en la ciudad de Palmira (Valle del Cauca). El ADN se extrajo utilizando el DNeasy Plant Mini Kit de Quiagen.

### Selección de marcadores microsatélites

Se evaluaron cuatro loci microsatélites seleccionados de los descritos por Gaitán, (2003), originalmente diseñados para *Ceroxylon alpinum* y *C. sasaimae*, y posteriormente transferidos a *C. quinduense* por la investigadora María José Sanín.

### Análisis estadístico de los loci microsatélites

La conservación del acervo genético de la población del Valle en parte depende de la proveniencia de los individuos que van a ser introducidos en Cocora en las actividades de repoblamiento. Con este fin, lo ideal es contar con individuos que concuerden genéticamente con los que crecen naturalmente en Cocora. En este proyecto se tenía el objetivo de evaluar la similaridad genética entre 60 individuos del Jardín Botánico del Quindío y la población de Cocora. Por motivos ajenos al proyecto, referidos al manejo de éstos en el Jardín Botánico del Quindío, solo se pudieron evaluar 30 individuos.

Los análisis de los microsatélites indicaron la diversidad genética presente en el banco de palmas evaluados del Jardín Botánico. En la figura 1 se puede observar

que hay una mayor representación de cierto tipo de alelos, como es el caso de alelo 190 para el marcador Cs5, alelos 156, 150 para el marcador Cs30, alelos 146, 150 para el marcador Cs3 y alelo 116 para el marcador Ca7; esto indica que hay una alta similitud entre los individuos del jardín, lo que se refleja en una baja diversidad de alelos en el banco de palmas. Las implicaciones de la baja diversidad genética puede llevar a que las poblaciones naturales se extingan, dado que los niveles de endogamia o parentesco aumentarían lo que ocasionaría a largo plazo que las poblaciones no tengan las condiciones en su genoma para afrontar cambios en el ambiente, no se puedan adaptar y serían más vulnerables a desaparecer.

Lo observado en el banco de palmas es un reflejo de las condiciones en las cuales se encuentran las palmas del Valle de Cocora, dado que los cambios en el paisaje, la transformación de su hábitat a potreros ocasiona que disminuya el número de individuos que se pueden reproducir, por lo cual esta reproducción para un posterior relevo generacional estará limitada a individuos muy cercanamente emparentados lo que como se menciona anteriormente reduce la diversidad y lleva a la desaparición de la población.

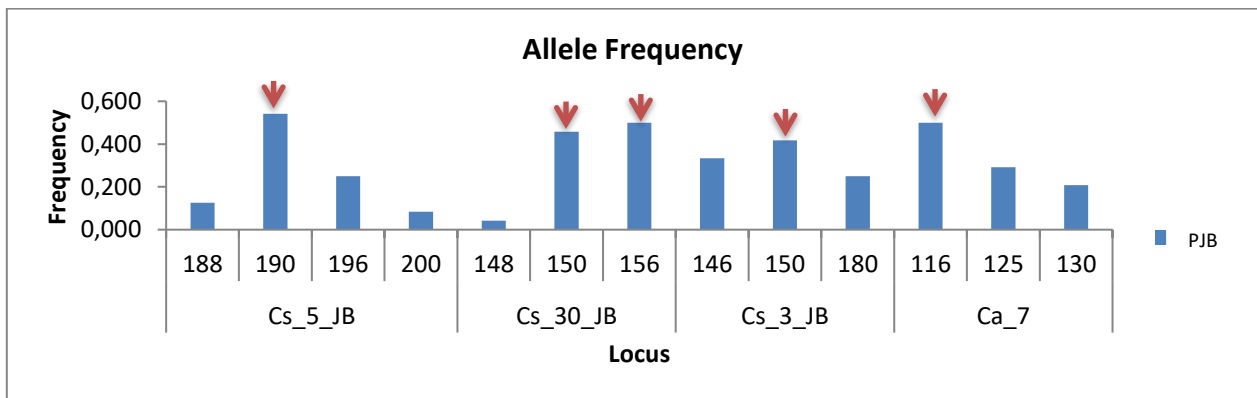


Figura 1. Frecuencia alélica de los individuos del Jardín Botánico PJB (Población del Jardín Botánico). Las flechas indican los alelos que están en mayor proporción en la población.

En función de lo anterior la viabilidad de la siembra de los individuos del Jardín Botánico del Quindío se aprueba desde el punto de vista genético, dada la similitud genética encontrada en los individuos evaluados y la población del Valle de Cocora evaluada previamente por Sanín (2013) (Figura 2). Se establece

entonces que los individuos del Jardín son aptos para ser utilizados en el programa de repoblamiento de la CRQ en vinculación con la universidad Nacional.

Es importante resaltar que la diversidad genética de los 30 individuos del Jardín Botánico del Quindío es menor que la diversidad genética de los individuos de la población natural de Cocora. Como la cantidad de individuos a introducir no es tan grande, y dado que los individuos tienen genotipos compatibles con los de Cocora, no consideramos que se vaya a ver afectada de manera importante la diversidad nativa. Sin embargo, es relevante para un trabajo sistemático de repoblamiento, que el material que se introduzca se obtenga a partir de diferentes hembras, para asegurar que la diversidad genética introducida sea amplia, acercándose a la población natural.

La diversidad genética o las características genéticas son las causantes de determinar cómo se comporta la especie a cambios en el ambiente, es decir, la información codificada en su genoma es fundamental para determinar la adaptación a ambientes cambiantes como lo son las partes tropicales, en especial la zona Andina. Por lo cual, se entiende que a mayor diversidad genética, las especies tienen mayores probabilidades de sobrevivir a cambios en el ambiente, por lo que las especies con poca diversidad genética tienen mayor riesgo frente a esos cambios.

Para las poblaciones naturales de palmas, la transformación progresiva de su hábitat, la reducción del mismo y del número de individuos, son varios factores que han venido afectando la continuidad de las palmas en el Valle de Cocora. Para evitar la desaparición de esta especie emblemática, el mantenimiento del pool génico alto evitando la pérdida de diversidad genética es una herramienta muy importante para la conservación de la palma de cera y el mantenimiento de las poblaciones en el Valle de Cocora, ya que, manteniendo este pool génico, las palmas naturalmente podrán afrontar los cambios en su hábitat y podrán sostenerse en el mismo, así evitar la crisis ambiental que llegaría con la desaparición de la palma, puesto que esta es una especie que sostiene todo un ecosistema, teniendo varias especies asociadas como lo son el Loro Orejiamarillo y el Oso de anteojos que se alimentan de sus frutos.

A continuación se da la lista de los individuos aptos para la siembra:

Individuos	Porcentaje de concordancia miscrosatélites (%)
------------	---

JB27	60
JB29	60
JB30	60
JB33	75
JB34	75
JB35	70
JB36	70
JB37	70
JB38	70
JB39	60
JB40	60
JB41	60
JB42	60
JB43	60
JB44	60
JB45	60
JB46	60
JB47	60
JB48	60
JB49	70
JB50	70
JB54	60
JB56	60
JB57	60



JB27	60
JB29	60
JB30	60
JB33	60
JB34	60
JB35	60

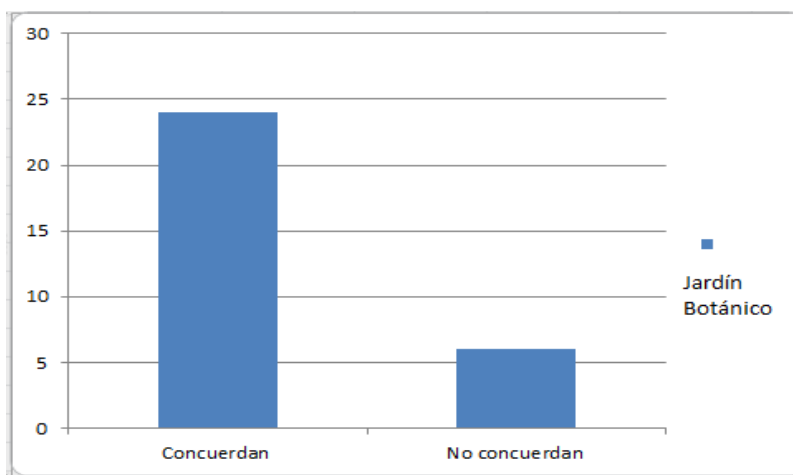


Figura 2. Porcentaje de individuos concordantes con el perfil genético de la población de Cocora.

Los resultados son el resultado del trabajo entre la CRQ y el Grupo de Investigación de Palma de la Universidad Nacional, convenio que busca la integración de la investigación sería e integral con los proyectos sociales en lo que se ve involucrado el ambiente y la sociedad.

**KATHERINE CHACÓN VARGAS & MARÍA JOSÉ SANÍN PÉREZ**

#### **12.4 Fotos siembra de palmas jóvenes del Jardín botánico en el Valle de Cocora.**

Actividad encabezada por la CRQ el 22 de abril del 2015.



