

# Estructura y diversidad genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* (*Magnoliaceae*)

## Structure and genetic diversity of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* (*Magnoliaceae*)

Jhonny Quintana Delgado<sup>1</sup>, Majela Hernández Rodríguez<sup>1,\*</sup>, Ernesto Testé<sup>2,3</sup>, Alejandro Palmarola Bejerano<sup>2</sup>, Emily Veltjen<sup>4,5</sup>, Marlyn Valdés de la Cruz<sup>1</sup>, Pieter Asselman<sup>4</sup>, Isabel Larridon<sup>4,6</sup>, Marie-Stéphanie Samain<sup>4,7</sup> y Luis Roberto González-Torres<sup>8,9</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, 25 e/ I y J, Vedado, La Habana, Cuba. C.P. 10400. <sup>2</sup>Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana, Carretera "El Rocío" km 3½, Boyeros, La Habana, Cuba. C.P. 19230. <sup>3</sup>Université Paris-Saclay, Ecologie Systématique et Evolution, 362 Rue du Doyen André Guinier, Orsay, France. C.P. 91405. <sup>4</sup>Ghent University, Department of Biology, Systematic and Evolutionary Botany Lab, K.L. Ledeganckstraat 35, Gent, Belgium. C.P. 9000. <sup>5</sup>Ghent University Botanical Garden, K.L. Ledeganckstraat 35, Gent, Belgium. C.P. 9000. <sup>6</sup>Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, UK. C.P. TW93AE. <sup>7</sup>Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Red de Diversidad Biológica del Occidente Mexicano, Avenida Lázaro Cárdenas 253, Pátzcuaro, Michoacán, México. C.P. 61600. <sup>8</sup>The University of British Columbia, 2329 West Mall, Vancouver. C.P. BC6T1Z4. <sup>9</sup>Department of Biology, Douglas College, New Westminster, Canadá. C.P. V3M5Z5. \* Autor para correspondencia (e-mail: [majelahr@gmail.com](mailto:majelahr@gmail.com)).

### RESUMEN

*Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, endémica de la Sierra Maestra, Cuba, y categorizada En Peligro de extinción, presenta poblaciones históricamente reducidas por la tala ilegal, la degradación del hábitat y la sobreexplotación. En las poblaciones de plantas amenazadas es importante comprender los efectos de los factores genéticos, porque permiten reforzar los planes de conservación y diseñar estrategias más efectivas que reduzcan su probabilidad de extinción. Por ello, los objetivos de la presente investigación son: describir la estructura y diversidad genética, y comprobar la presencia de endogamia y de eventos de cuello de botella en esta subespecie. Se utilizó ADN extraído de tejido foliar de 173 individuos colectados en cinco localidades, que fueron genotipificados a partir de 21 marcadores microsatélites. La diversidad genética se evaluó mediante la heterocigosidad, la diversidad alélica, el coeficiente de endogamia y el coeficiente de diferenciación. Se comprobó la presencia de aislamiento por distancia y de eventos de cuello de botella. La Bayamesa fue la localidad más diversa y Pico Turquino presentó valores elevados de endogamia. La población se encontró genéticamente estructurada en tres grupos, siendo la localidad Gran Piedra la que mostró los mayores valores para el coeficiente de diferenciación. La población no ha sufrido un evento de cuello de botella reciente, pero sí presenta indicios de aislamiento por distancia. Se recomienda la creación de viveros en las localidades de Gran Piedra y La Bayamesa, así como emplear a los individuos de esta última para reforzar a las localidades Pico Caracas, Turquino y El Gigante, con la finalidad de aumentar la diversidad genética global.

**Palabras claves:** genética de la conservación, magnolias, marcadores microsatélites, variación genética

### ABSTRACT

*Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, endemic to the Sierra Maestra, Cuba and categorized as Endangered, has historically reduced populations due to illegal logging, habitat degradation and overexploitation. In threatened plant populations, understanding the effects of genetic factors makes it possible to reinforce conservation plans and design more effective strategies that reduce their probability of extinction. Therefore, the objectives of this research are to describe the genetic structure and diversity, and to verify the presence of inbreeding and bottleneck events in this subspecies. Leaf tissue DNA from 173 individuals collected in five locations, genotyped from 21 microsatellite markers, was used. Genetic diversity was assessed by heterozygosity, allelic diversity, inbreeding coefficient, and differentiation coefficient. The presence of isolation by distance and bottleneck events was verified. La Bayamesa was the most diverse locality and Pico Turquino presented high values of inbreeding. The population was genetically structured in three groups, where Gran Piedra showed the highest values for the differentiation coefficient. The population has not suffered a recent bottleneck event, but it does show signs of isolation by distance. The creation of nurseries in the localities of Gran Piedra and La Bayamesa is recommended, as well employing individuals from La Bayamesa to reinforce the localities Pico Caracas, Turquino and El Gigante with the goal of increase the global genetic diversity.

**Keywords:** conservation genetics, magnolias, microsatellite markers, genetic variation

**Citación:** Quintana, J., Hernández, M., Testé, E., Palmarola, A., Veltjen, E., Valdés, M., Asselman, P., Larridon, I., Samain, M.S. & González-Torres, L.R. 2022. Estructura y diversidad genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* (*Magnoliaceae*). *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 43: 33-46.

**Recibido:** 5 de marzo de 2021. **Aceptado:** 17 de junio de 2021. **Publicado en línea:** 20 de abril de 2022. **Editor encargado:** Gabriela Rijo de Francisco.

### INTRODUCCIÓN

La reciente extinción de muchas especies y el gran número de especies amenazadas ha influido de manera significativa en la importancia de la genética de la conservación en el siglo XXI (Allendorf & Luikart 2007, Eguiarte & al. 2013). Muchos son los estudios que demuestran que, a partir de investigaciones de genética aplicada, no solo se identifican especies en peligro de extinción, sino los eventos que han podido afectarlas y cómo revertirlos. La genética de la conservación se convierte así en

una valiosa herramienta que propicia enfoques más amplios y permiten una conservación más efectiva (Frankham & al. 2002, Eguiarte & al. 2006, Allendorf & Luikart 2007).

Autores como Eguiarte & al. (2006) sugieren que la distribución de la variabilidad genética en poblaciones de plantas que presentan algún grado de amenaza es un aspecto clave y fundamental en el diseño de estrategias de conservación. Sin embargo, para ello se hace indispensable comprender

los factores demográficos y genéticos que determinan su dinámica poblacional (Allendorf & Luikart 2007), así como la interacción entre ambos grupos de factores. Por ejemplo, en la última década, las investigaciones experimentales y de campo han demostrado que la fragmentación del hábitat y la disminución del número de individuos reducen el tamaño efectivo de la población. De la misma manera, la mayoría de los genetistas consideran el tamaño de la población como un factor importante para mantener la variación genética (Ellegren & Galtier 2016, Turchetto & al. 2016).

Precisamente, entre las metas de la genética de la conservación se encuentra minimizar el efecto de los problemas relacionados con tamaños efectivos pequeños. En poblaciones reducidas, las mutaciones deletéreas se acumulan de manera recesiva y constituyen una carga genética para la población. La carga genética provoca una reducción en la adecuación genética que se conoce como depresión por endogamia (Eguiarte & al. 2006). Esta fuerza evolutiva actúa cuando los apareamientos no son al azar, sino entre individuos relacionados, con la consecuente pérdida de la diversidad (Frankham & al. 2002, Edmands 2007) y de la capacidad de responder a condiciones cambiantes. Es por ello que la diversidad genética se considera una de las tres formas de conservación de la biodiversidad, reconocidas por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN), junto con las especies y la diversidad del ecosistema (Garner & al. 2020).

La familia *Magnoliaceae*, con cerca del 50 % de sus especies categorizadas como amenazadas según Rivers & al. (2016), es una de las familias de plantas que podrían beneficiarse con los estudios de genética de la conservación, dado que, frecuentemente, presentan poblaciones reducidas y con distribución restringida. Aunque existen ejemplos de programas de conservación *in situ* en el grupo (Cogollo & al. 2001, Palmarola & al. 2012), las magnolias neotropicales han sido escasamente estudiadas desde el punto de vista molecular (Cires & al. 2013, Veltjen & al. 2019, Hernández & al. 2020a).

Cuba es considerada el mayor punto de biodiversidad de la familia *Magnoliaceae* en el Caribe insular, representada solo por el género *Magnolia*, con siete taxones endémicos (Greuter & Rankin 2017), que se agrupan en dos secciones: *Magnolia* y *Talauma*, todos con alguna categoría de amenaza (González-Torres & al. 2016). *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* es uno de los taxones de la sección *Talauma* de mayor distribución y es endémica de la Sierra Maestra, en el oriente de Cuba. La subespecie se desarrolla en bosque pluvial montano, bosque nublado y bosque siempreverde mesófilo submontano, entre 800 y 1 800 msn sobre suelo ácido (Simón 2020). Las poblaciones de esta subespecie están reducidas por la tala para la obtención de madera y por la fragmentación de su hábitat, lo cual redujo el número de efectivos poblacionales (Palmarola & al. 2015). Actualmente, las principales amenazas a las que se enfrenta esta subespecie son la tala furtiva, las limitaciones reproductivas y la baja regeneración natural, derivada de la sobreexplotación y acentuada por la explo-

tación actual, lo que eleva su categoría de amenaza a En Peligro (Hernández & al. 2020b).

Los estudios que se han realizado en esta subespecie incluyen aspectos de su estructura poblacional (Molina-Pelegrín & al. 2014, Testé & al. 2019), de morfometría foliar (Hernández 2014) y una caracterización preliminar de la diversidad genética (Veltjen & al. 2019) en base a algunos individuos del Pico Turquino. Sin embargo, no existe ningún estudio que se centre en la caracterización genética de la subespecie en todo su rango de distribución. Por ello, los objetivos de la presente investigación son: describir la estructura genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, cuantificar la diversidad genética global y por localidad de *M. cubensis* subsp. *cubensis* y comprobar la presencia de endogamia y la existencia de eventos cuello de botella en las localidades de *M. cubensis* subsp. *cubensis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Recolecta de las muestras

Las colectas de campo se realizaron entre 2015 y 2018, mediante un muestreo aleatorio simple, en cinco áreas protegidas de la Sierra Maestra, en la región suroriental de Cuba: Reserva Ecológica Pico Caracas (REC) (4 juveniles, 46 adultos, 36 muestreados), Parque Nacional Pico Turquino (TUR) (47 juveniles, 757 adultos, 44 muestreados), Parque Nacional La Bayamesa (BAY) (17 juveniles, 302 adultos, 47 muestreados), Reserva Ecológica El Gigante (GIG) (2 juveniles, 46 adultos, 17 muestreados) y Paisaje Natural Protegido Gran Piedra (GRP) (1 juvenil, 59 adultos, 29 muestreados) (Figura 1). En cada localidad prospectada se colectaron muestras de hojas de 173 individuos adultos de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, en función de la disponibilidad y acceso a las mismas. Se asume como "población" el total de individuos de la subespecie y "subpoblación" o "localidad" los diferentes núcleos poblacionales dentro del área de distribución, según los criterios propuestos por la IUCN (2001).

### Extracción de ADN y selección de los microsatélites

A partir de tejido foliar se extrajo el ADN de los individuos colectados en cada localidad, con el empleo del protocolo CTAB de Doyle & Doyle (1990), con *MagAttract Suspension G solution* (Qiagen, Germantown, USA; Xin & Chen 2012) y mediado por lavado (Larridon & al. 2015). Se comprobó la calidad del ADN extraído mediante un *NanoDrop Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific*, Waltham, USA), a través de la lectura de los valores de Densidad Óptica (DO) a las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm.

La selección de los microsatélites se realizó a partir de los 172 marcadores confeccionados por Veltjen & al. (2019) para especies del género *Magnolia* en el Neotrópico. Del total de marcadores disponibles, fueron seleccionados 21 marcadores polimórficos que no presentaran errores de genotipificación como alelos nulos o presencia de alelos de gran tamaño que pudieran no amplificar (Tabla I). Se desarrollaron PCR *multiplex*, en los cuales los cebadores directos se unieron a

una cola universal en la posición 5'. Las sondas fluorescentes FAM, NED, PET y VIC fueron ligadas a las colas T3, Hill, Neo y M13, respectivamente. El diseño de las PCR *multiplex* se realizó en el programa *Multiplex Manager* (Holleley & Geerts 2009); las variantes resultantes fueron perfeccionadas y se obtuvieron tres PCR *multiplex*, con siete marcadores cada uno. La determinación de los genotipos fue realizada visualmente mediante la lectura de los electroferogramas en el programa *Geneious Prime* (<http://www.geneious.com>, Kearsse & al. 2012).

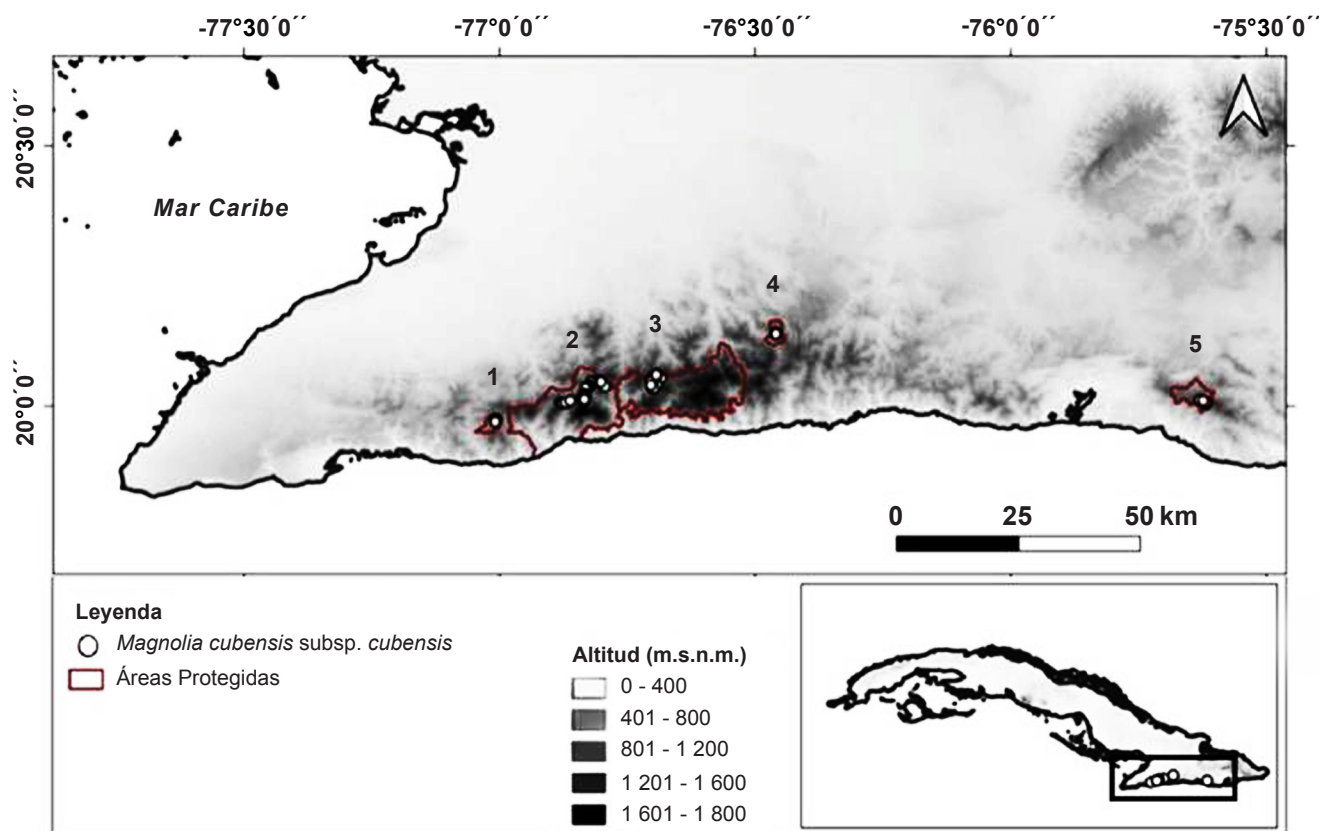
### Caracterización de los microsatélites

El equilibrio de Hardy-Weinberg fue comprobado para cada *locus* en todas las localidades, a través del algoritmo de las Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (Guo & Thompson 1992) y se estimaron los valores del coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) de Weir & Cockerham (1984). Para determinar la existencia de ligamiento entre *loci* y comprobar si la información se transmite independientemente, se realizó un análisis de desequilibrio por ligamiento, según el algoritmo propuesto por Raymond & Rousset (1995). Los parámetros de la corrida para ambos análisis en el programa *Genepop v.4.3* (Rousset 2008) fueron los siguientes: 10 000 pasos de desmemorizaciones, 50 grupos y 5 000 iteraciones por grupo. Con el objetivo de controlar el error estadístico de tipo I se aplicó la corrección de Bonferroni al valor del nivel de significación ( $\alpha = 0,05$ ),

sin considerar para el cálculo los *loci* monomórficos (Waples 2015). La significación estadística para cada prueba se calculó sobre la base del valor de  $\alpha$  corregido.

### Estructura genética

Para estimar la probabilidad de pertenencia de cada individuo a una especie o localidad, sobre la base de su genotipo y determinar la posible estructura genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, se empleó el programa *Structure v.2.3* (Hubisz & al. 2009). Los parámetros de las corridas fueron los siguientes: 10 000 réplicas MCMC, luego de un período inicial (*burn-in*) de 10 000 permutaciones, con frecuencias alélicas correlacionadas y bajo un modelo de mezcla. Para obtener la probabilidad de pertenencia de cada individuo a cada grupo genético, se ejecutó el análisis para valores de K (número de grupos genéticos) desde uno hasta ocho (el doble de localidades muestreadas), con cinco repeticiones independientes. El número más probable de grupos fue determinado según el método de Evanno & al. (2005), a partir del valor de Delta K ( $\Delta K$ ) y los valores medios de probabilidad [ $\ln P(K)$ ], obtenidos en la plataforma en línea *Structure Harvester v.0.6.94* (Earl & von Holdt 2012). El valor de corte para considerar la no pertenencia de un individuo a un grupo específico fue de un coeficiente de asignación menor a 0,5 (Evanno & al. 2005).



**Fig. 1.** Localización geográfica de los individuos de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* recolectados en la Sierra Maestra, Cuba oriental. 1. Pico Caracas (REC); 2. Pico Turquino (TUR); 3. La Bayamesa (BAY); 4. El Gigante (GIG); 5. Gran Piedra (GRP).

**Fig. 1.** Geographical location of the individuals of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* collected in the Sierra Maestra, eastern Cuba. 1. Pico Caracas (REC); 2. Pico Turquino (TUR); 3. La Bayamesa (BAY); 4. El Gigante (GIG); 5. Gran Piedra (GRP).

Debido a que el programa *Structure* presenta como premisas el equilibrio de Hardy-Weinberg y el desequilibrio por ligamiento, en el presente estudio se eliminaron los marcadores que se desviaban del equilibrio genético en varias localidades y/o presentaban ligas. Con los 14 marcadores microsatélites resultantes luego de este filtro, los resultados fueron muy similares. Por lo tanto, se decidió realizar la inferencia de la estructura genética de la subespecie con todos los marcadores, con la finalidad de mantener la homogeneidad con el resto de los análisis y evitar la pérdida de resolución e información.

#### Diversidad genética por localidad y global

Para determinar la diversidad genética, se calculó el número promedio de alelos por *locus* ( $N_A$ ), el número de alelos privados ( $A_p$ ), la riqueza alélica ( $A_R$ ), la heterocigosidad observada ( $H_o$ ), la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), la proporción de *loci* polimórficos (P %) y el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), para cada *locus*, localidad y toda la subespecie. Para ello, se

empleó la herramienta *add-in* de *Microsoft Excel GeneAIEx v.6.1* (Peakall & Smouse 2012). Se estimaron los niveles de diferenciación genética entre localidades, mediante comparaciones pareadas con el uso del índice de fijación  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham 1984), en el programa *GenePop v.4.3* (Rousset 2008). Para la interpretación de los valores de  $F_{ST}$  se siguió el criterio de Hartl & Clark (1997).

Para identificar posibles patrones de aislamiento por distancia, se realizaron pruebas pareadas de Mantel con 999 aleatorizaciones de los datos originales. Mediante este análisis se comprobó la existencia de correlación significativa ( $\alpha < 0,05$ ) entre una matriz de distancias genotípicas codominantes lineales (DGL) y una matriz de distancias geográficas. Para visualizar la relación entre ambas matrices, se representaron en un gráfico los valores de distancias genéticas vs distancias geográficas. A partir de la matriz DGL, se realizó un Análisis de varianza molecular (AMOVA) con 999 permutaciones, con la finalidad de cuantificar el porcentaje de variación genética

**TABLA I**

**Alelos, tamaño mínimo (Mín) y máximo (Máx), secuencias directa e inversa, y PCR multiplex de los 21 marcadores microsatélites seleccionados para la caracterización genética *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental.**

**TABLE I**

**Alleles, minimum (Min) and maximum (Max) size, forward and reverse sequences, and multiplex PCR of the 21 microsatellite markers selected for the genetic characterization *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba.**

Alelos	Mín	Máx	Secuencia directa	Secuencia inversa	PCR multiplex
MA39_023_T3	97	127	TCCAACGAGTACTTGGGCAG	GATGCGTCCTTGAGTCCCAA	1
MA39_093_M13	131	161	GTAGCCATGTGGGTCTGTCC	AGTTGGTAGGGCACATGTCC	1
MA40_045_M13	232	262	TTGTGGGCCAAGCTCGATAG	ATTGTGGCATGTACCTCGCA	1
MA42_063_T3	203	233	ATAGCAACAACGTAGCCGGT	TGGCGAGGTCCCTCTACTAC	1
MA42_087_Neo	157	187	TAAGTCAGAACCCAGCTGGC	GGCGAATCGGGACCCTTTAA	1
MA42_241_Hill	92	122	GGGTACCCTATGGTCCAACC	GTCCGACTAAGGCCATTGT	1
MA42_481_Hill	197	227	CGATCTGAGTCCGCAAGAGT	AGACGCAGAAATCTCAGCAAGA	1
MA39_185_Neo	209	239	CGGGTGTGTAGATGACGCT	AAGACACGGAATGGGACGAG	2
MA39_442_Neo	109	139	AGTCGATCCTCTTGCTGCAC	GAGGGAGCATCGGCCATTAC	2
MA41_076_Neo	176	206	AACAACGCTGGGTGATGGAA	TGGAGTTGACGCCTCTAGGA	2
MA41_373_Hill	165	195	GCGCCCAATCAGAACAACAAC	GGGAAGAGCTTCTTTGCGCA	2
MA42_203_T3	102	132	TGAAGAACACAGGCCATGGA	GAGAGGTGCTTCACGGGTAG	2
MA42_265_M13	238	268	CGCACACCAAAGCTGCATT	CGGCTACTTCCAAGGGATG	2
MA42_471_T3	153	183	TGATGAAGAGCCCAGATCGTC	TGGCCTTGTTCTCCATACGT	2
MA41_264_M13	173	203	AACAGCCTTTGGGAAGTGCA	CAGCCATTCCGCTTCCCTTA	3
MA42_077_T3	211	241	GAGACATGGAACCCACACGT	CTGGTGGTCTAGCCGATCTG	3
MA42_296_T3	144	174	TTGACAGTCTGGCAAGGTGG	GAGGGCTCATAGTGGTGGC	3
MA42_397_Hill	98	128	TAGTAGCAGGGTCCCTCCTC	TCCATTATTAGGGTGGGCA	3
MA42_413_T3	103	133	GCCGAGTGCAAGCCATAAGG	TGCACCTAAGCTCCACAGTC	3
MA42_421_M13	280	310	GACAGCAGACCTGACCGATT	GACCAGTGCATCCCATCAA	3
MA42_472_Neo	140	170	AGAGTTACACATGCAAACCCG	TGATGTTGTTGCTCGGCTGA	3

en tres niveles: localidades, individuos y marcadores. Ambos análisis fueron realizados en *GeneA/Ex v.6.1* (Peakall & Smouse 2012).

### Eventos de cuello de botella en localidades

La presencia de cuello de botella en las cinco localidades muestreadas fue comprobada mediante la descripción gráfica de la distribución de frecuencias alélicas por *locus* y la prueba de Wilcoxon para los tres modelos de mutación: Mutación de Infinitos Alelos (IAM), Mutación en Dos Fases (TPM) y Mutación por Pasos (SMM). Ambos análisis fueron realizados en el programa *Bottleneck v.1.2.02* (Cornuet & Luikart 1996).

## RESULTADOS

### Caracterización de los microsatélites

La prueba de las MCMC para determinar el equilibrio genético mostró que 16 de los 21 marcadores presentaron diferencias significativas ( $p < 0,0025$ ; corregida por Bonferroni) en, al menos, una localidad; lo que representa el 76,19 % del total. Los *loci* MA42\_087, MA42\_077, MA42\_397 y MA42\_471 presentaron desviaciones en al menos tres de las cinco localidades. En TUR y GRP, más del 50 % de los *loci* presentaron diferencias significativas, mientras que GIG tan solo presentó un *locus* (MA42\_471) con diferencias significativas. Para los *loci* MA39\_093, MA42\_265, MA39\_442 y MA42\_413 fue imposible determinar el valor del estadístico y su probabilidad en algunas localidades, por ser monomórficos o presentar muy bajos valores de  $H_o$  y  $H_e$  (Tabla II).

El análisis de desequilibrio por ligamiento mostró que existen diferencias significativas ( $p < 0,00024$ ; corregida por Bonferroni) para 12 pares de las 210 combinaciones, lo que representa un 5,71 % del total. Algunos *loci* como MA39\_093, MA39\_185 y MA42\_472 se encontraron en más de un par de combinaciones que presentan ligas.

### Estructura genética

Según el  $\Delta K$ , se puede observar que el modelo se ajusta con mayor probabilidad a un valor de  $K = 3$  (Figura 2A). Sin embargo, en el análisis de los valores medios de  $[\ln P(K)]$  se observó que el valor máximo de probabilidad, antes de la inflexión de la curva, corresponde al modelo para  $K = 5$  (Figura 2B), que presentó el segundo mayor valor de  $\Delta K$ . Por tanto, según los resultados de ambos análisis,  $\Delta K$  y  $[\ln P(K)]$ , se analizó la estructura genética para un valor de  $K = 3$  y  $K = 5$ , este último representa el número de localidades muestreadas.

La estructura genética para  $K = 3$  (Figura 2C) mostró en el primer grupo, ejemplares de GIG y BAY y la mayoría de los de TUR; en el segundo, individuos de REC y algunos de TUR; y en el tercero, individuos de GRP. El 95,95 % de los individuos fueron correctamente asignados a sus localidades y el resultado fue similar en las cinco repeticiones del modelo. La localidad TUR fue la única que presentó individuos (siete) que, dado su genotipo, mostraron una probabilidad mayor al 50 % de pertenecer al grupo REC. Las localidades GRP y REC presentaron grupos genéticos muy bien definidos y valores bajos (menores del 5 %) de mezcla con el resto de las localidades.

La estructura genética para  $K = 5$  (Figura 2D) mostró resultados muy similares a  $K = 3$  y fueron asignados correctamente a sus localidades el 97,11 % de los individuos. Se conformaron cinco grupos genéticos, grupo 1: individuos de GIG (excepto un individuo), uno de TUR y dos de BAY; grupo 2: todos los ejemplares de REC y uno de TUR; grupo 3: la mayoría de los individuos de TUR; grupo 4: todos los individuos de GRP; grupo 5: la mayoría de los individuos de BAY y algunos de TUR.

### Diversidad genética por localidad y global

El número promedio de alelos para cada *locus* ( $N_A$ ) mostró valores mínimos en MA39\_093 con 1,4 y máximos en MA42\_397 con 13,8. El *locus* de mayor riqueza alélica fue MA42\_087 con aproximadamente 12 alelos, mientras que MA39\_093 presenta valores cercanos a un alelo. La heterocigosidad observada ( $H_o$ ) mostró valores que van desde cero para MA39\_093 hasta 0,74 para MA42\_063; 17 marcadores mostraron valores de  $H_o$  superiores al 50 %, mientras que todos los marcadores (excepto MA39\_093) superaron el 20 % de  $H_o$ . Los *loci* MA42\_397, MA42\_087 y MA42\_472 presentaron los mayores valores de diversidad en todas las localidades, y los *loci* MA39\_093, MA42\_265 y MA39\_442 los menores (Tabla II).

Los individuos de BAY mostraron los mayores valores para las medidas de diversidad genética:  $N_A$  (6,8),  $A_R$  (5,24), y  $H_o$  (0,5). Mientras que los valores mínimos los obtuvieron GIG ( $N_A = 5,1$ ), REC ( $A_R = 4,317$ ) y TUR ( $H_o = 0,37$ ). En todas las localidades se observa un déficit de heterocigóticos (FIS), con una deficiencia más marcada en los individuos de TUR, donde se obtuvo el mayor coeficiente de endogamia con 0,37. En cambio, BAY presentó el menor valor (0,11) para este coeficiente. Al calcular la proporción de *loci* polimórficos para cada localidad, GRP y TUR mostraron un 100 % de polimorfismo. En BAY el polimorfismo fue de 90,48 %, ya que dos de sus marcadores resultaron monomórficos; mientras que, en GIG y REC fue de un 85,7 % (tres marcadores monomórficos) (Tabla II).

Las localidades estudiadas presentan 41 alelos que son variantes privadas, lo que indica que el 27,97 % de los alelos son formas exclusivas de alguna de ellas. Toda la población comparte el 70 % de sus alelos. Los mayores valores para el número de alelos privados (14), individuos con alelos privados (28) y total de alelos privados (28) se encontró en GRP. A su vez, en BAY solo se encontraron cuatro alelos privados diferentes, y siete alelos privados en total. Sin embargo, la localidad con menos individuos con alelos privados fue REC (17) (Figura 3).

Se obtuvieron valores altos de diferenciación genética entre las localidades estudiadas según el  $F_{ST}$ . La población de GRP presenta valores elevados de diferenciación genética con TUR y REC, y diferencias marcadas con el resto de las localidades. Diferencias moderadas fueron encontradas entre TUR con respecto a BAY y REC, y entre GIG y BAY. Las localidades TUR y BAY presentaron el menor valor de diferenciación genética. El resto de las combinaciones mostraron grandes diferencias (0,15 – 0,25) (Tabla III).

**TABLA II**

**Medidas de diversidad genética para los 21 marcadores microsatélites empleados en la caracterización genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental, 2015-2018.** REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra. N<sub>A</sub>: Número promedio de alelos por locus; A<sub>R</sub>: Riqueza alélica; H<sub>o</sub>: Heterocigosidad observada; H<sub>e</sub>: Heterocigosidad esperada; F<sub>IS</sub>: Valores del índice de fijación. El asterisco indica valores significativos de probabilidad (p < 0,0025; corregida por Bonferroni); NI: Comparación no informativa por ser un locus monomórfico o presentar valores bajos de H<sub>o</sub> y H<sub>e</sub>.

**TABLE II**

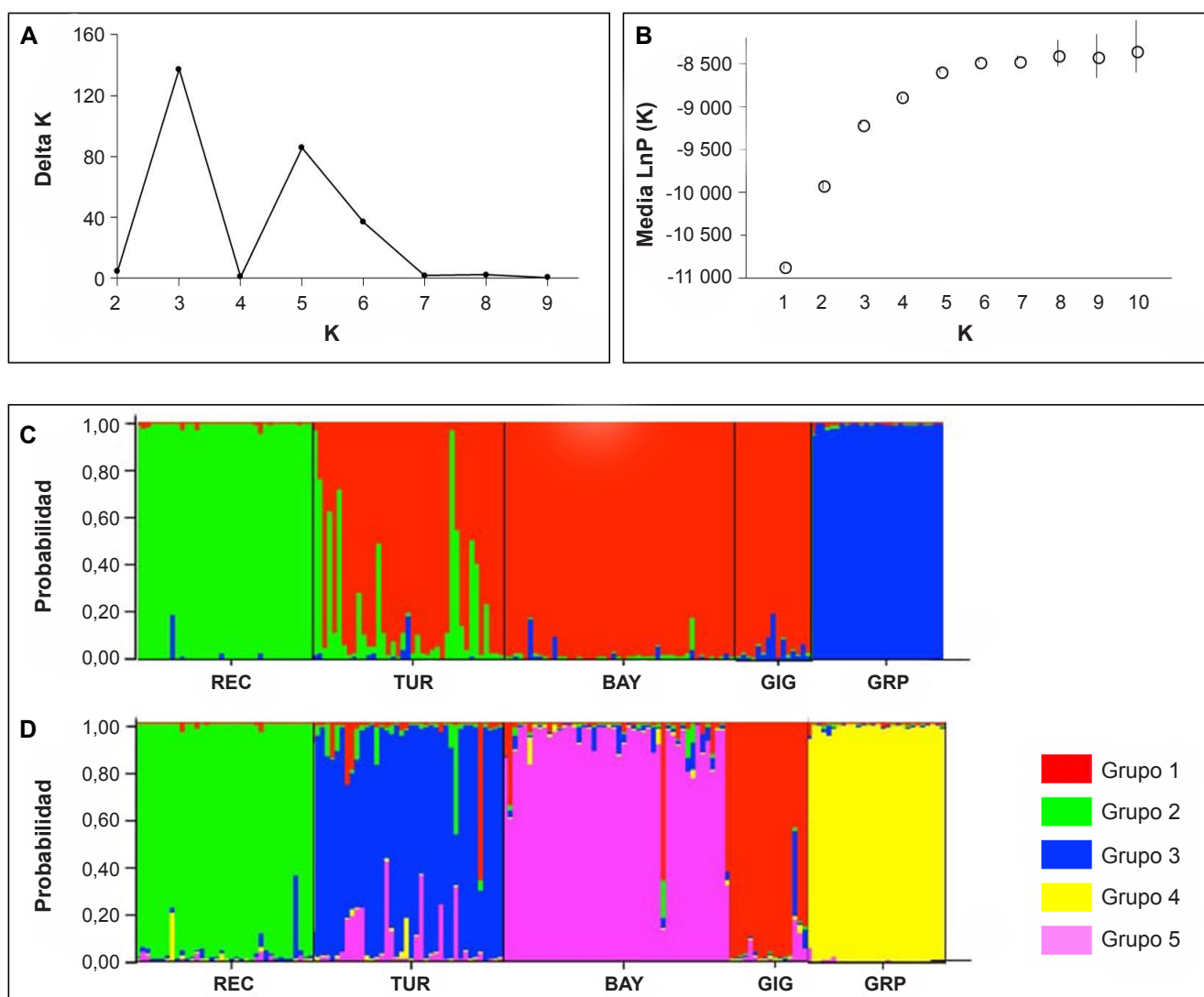
**Genetic diversity measures for the 21 microsatellite markers used in the genetic characterization of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in the Sierra Maestra, eastern Cuba, 2015-2018.** REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra. N<sub>A</sub>: Average number of alleles per locus; A<sub>R</sub>: Allelic wealth; H<sub>o</sub>: observed heterozygosity; H<sub>e</sub>: expected heterozygosity; F<sub>IS</sub>: Fixation index values. The asterisk indicates significant probability values (p < 0.0025; corrected for Bonferroni); NI: Non-informative comparison due to being a monomorphic locus or presenting low H<sub>o</sub> and H<sub>e</sub> values.

Locus	REC (N=36)						TUR (N=44)						BAY (N=47)						GIG (N=17)						GRP (N=29)						
	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	N <sub>A</sub>	A <sub>R</sub>	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	
MA39_023_T3	3	2,96	0,39	0,41	0,06	5	4,33	0,36	0,56	0,37*	6	5,16	0,7	0,63	-0,08	4	3,93	0,81	0,63	-0,27	10	7,6	0,7	0,8	0,13*	10	7,6	0,7	0,8	0,13*	
MA39_093_M13	1	1	0	0	NI	2	1,52	0	0,05	1	1	0	0	0	NI	1	1	0	0	0	NI	2	2	0	0,3	1,00*	2	2	0	0,3	1,00*
MA39_185_Neo	11	9,11	0,69	0,88	0,22	9	7,43	0,52	0,8	0,37*	13	10,4	0,9	0,9	0,02	5	4,74	0,69	0,69	0,52	4	4	0,7	0,7	0,01	4	4	0,7	0,7	0,01	
MA39_442_Neo	1	1	0	0	NI	2	1,31	0,03	0,03	NI	2	2	0,4	0,31	-0,23	2	2	0,25	0,49	0,52	2	2	0,2	0,2	-0,08	2	2	0,2	0,2	-0,08	
MA40_045_M13	8	5,53	0,5	0,58	0,14	6	5,48	0,53	0,69	0,26	9	6,5	0,7	0,77	0,07	6	5,79	0,73	0,76	0,06	8	6,3	0,7	0,7	0,07*	8	6,3	0,7	0,7	0,07*	
MA41_076_M13	2	2	0,33	0,48	0,31	3	2,24	0,21	0,19	-0,08	3	2,45	0,3	0,36	0,11	2	2	0,44	0,34	-0,25	4	3,8	0,6	0,6	0,04	4	3,8	0,6	0,6	0,04	
MA41_264_M13	7	5,62	0,64	0,75	0,16	6	4,76	0,54	0,67	0,2	6	5,21	0,8	0,78	0	6	5,77	0,69	0,63	-0,05	6	4	0,4	0,5	0,09	6	4	0,4	0,5	0,09	
MA41_373_HIII	4	3,06	0,14	0,41	0,66*	8	5,88	0,19	0,7	0,74*	5	3,9	0,1	0,4	0,87*	4	3,75	0,5	0,66	0,27	6	5,6	0,2	0,7	0,69*	6	5,6	0,2	0,7	0,69*	
MA42_063_T3	7	6,17	0,64	0,8	0,22*	9	7,31	0,65	0,81	0,21	9	7,81	0,9	0,86	-0,03	8	7,57	0,75	0,81	0,1	8	7,8	0,8	0,9	0,15	8	7,8	0,8	0,9	0,15	
MA42_077_T3	4	2,89	0,06	0,33	0,83*	3	2,97	0,28	0,46	0,39*	3	1,51	0	0,04	-0,01	2	2	0,13	0,47	0,75	3	2,7	0,3	0,3	0,25	3	2,7	0,3	0,3	0,25	
MA42_087_Neo	8	5,28	0,81	0,72	-0,1	6	4,77	0,27	0,54	0,51*	16	10,8	0,7	0,9	0,26	13	11,97	0,71	0,89	0,23	11	9	0,4	0,9	0,56*	11	9	0,4	0,9	0,56*	
MA42_203_T3	6	4	0,67	0,68	0,03	8	6,77	0,67	0,8	0,18	9	7,02	0,8	0,82	0,04	5	4,44	0,5	0,42	-0,17	5	4,6	0,7	0,7	0,07	5	4,6	0,7	0,7	0,07	
MA42_241_HIII	3	2,55	0,25	0,3	0,54	5	3,44	0,31	0,3	-0,02	3	2,96	0,5	0,52	0	4	3,99	0,5	0,65	0,23	6	5,2	0,5	0,7	0,22*	6	5,2	0,5	0,7	0,22*	
MA42_265_M13	1	1	0	0	NI	5	3,67	0,21	0,4	0,50*	1	1	0	0	NI	1	1	0	0	NI	2	2	0,5	0,5	0,01	2	2	0,5	0,5	0,01	
MA42_296_T3	6	4,88	0,58	0,64	0,1	9	7,2	0,54	0,81	0,35*	8	6,88	0,8	0,83	0,11	6	5,63	0,44	0,65	0,36	7	6,2	0,7	0,8	0,17	7	6,2	0,7	0,8	0,17	
MA42_397_HIII	17	11,79	0,94	0,89	-0,1	17	11,4	0,44	0,9	0,51*	14	10,8	0,6	0,9	0,37*	13	12,21	0,5	0,89	0,47*	8	5,9	0,4	0,7	0,38*	8	5,9	0,4	0,7	0,38*	
MA42_413_T3	3	2,27	0,08	0,13	0,38	2	1,85	0,08	0,12	0,37*	2	1,26	0	0,02	NI	1	1	0	0	NI	2	1,7	0	0,1	1	2	1,7	0	0,1	1	
MA42_421_M13	7	5,63	0,83	0,79	0	9	6,48	0,68	0,78	0,14	6	5,19	0,7	0,77	0,08	5	4,44	0,38	0,49	0,26	4	3,1	0,2	0,2	0,07	4	3,1	0,2	0,2	0,07	
MA42_471_T3	5	4,13	0,31	0,6	0,50*	8	6,62	0,31	0,74	0,59*	7	4,45	0,2	0,37	0,60*	3	2,94	0	0,51	1,00*	11	7,4	0,8	0,8	-0,07	11	7,4	0,8	0,8	-0,07	
MA42_472_Neo	5	3,66	0,44	0,64	0,32	8	6,41	0,39	0,77	0,51*	11	8,49	0,9	0,87	-0,02	1-0	8,73	0,81	0,82	0,04	7	5,1	0,5	0,6	0,07	7	5,1	0,5	0,6	0,07	
MA42_481_HIII	8	6,14	0,67	0,78	0,16	7	7	0,58	0,81	0,32	8	5,28	0,6	0,64	0,03	6	5,93	0,67	0,76	0,15	7	5,2	0,4	0,5	0,21	7	5,2	0,4	0,5	0,21	
Global	5,6	4,317	0,43	0,51	0,18	6,5	5,18	0,37	0,57	0,37	6,8	5,24	0,5	0,56	0,11	5,1	4,801	0,45	0,55	0,21	5,86	4,8	0,5	0,6	0,18	5,86	4,8	0,5	0,6	0,18	

La correlación entre todas las localidades mostró valores significativos del coeficiente de correlación. Dentro de cada una, solo TUR mostró valores de probabilidad significativos ( $p < 0,001$ ), no obstante, su valor de correlación es relativamente bajo ( $r = 0,280$ ). El análisis de varianza molecular reveló que el mayor porcentaje de variación (62 %) se encontró entre individuos de una misma localidad; un segundo nivel de variación entre localidades (37 %) y, la menor variación (1 %) dentro de individuos, o sea, entre los diferentes *loci* de un mismo individuo (Figura 4).

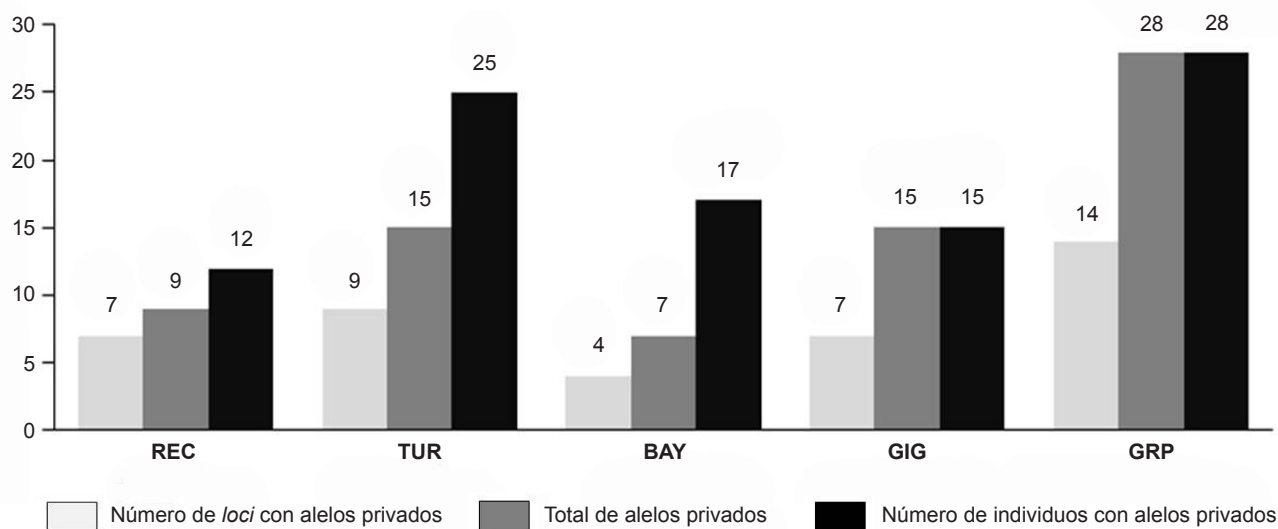
### Eventos de cuello de botella en localidades

La prueba de Wilcoxon indicó para REC diferencias entre la heterocigosidad observada en el equilibrio y la calculada por IAM (exceso de heterocigotos) y SMM (déficit de heterocigotos). TUR y GRP mostraron valores significativos para el déficit de heterocigotos por el SMM, mientras que BAY y GIG para el exceso de heterocigotos por el IAM (Tabla IV). Todas las localidades presentan una distribución de las frecuencias alélicas en forma de L (Figura 5).



**Fig. 2.** Estructura genética de los individuos de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental, 2015-2018, obtenidos con  $K = 1$  hasta  $K = 8$ , y cinco simulaciones por análisis. **A.** Valores de Delta K. **B.** Media de  $[\text{Ln } P(K)]$ . **C.** Probabilidad de asignación de los individuos estimada para  $K = 3$ . **D.** Probabilidad de asignación de los individuos estimada para  $K = 5$ . Cada individuo es representado como una barra vertical, dividida en segmentos coloreados que representan el grado de pertenencia a cada grupo genético. Cada color representa un grupo genético distinto y su asignación es independiente para cada valor de K. REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.

**Fig. 2.** Genetic structure of the individuals of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba, 2015-2018, obtained with  $K = 1$  to  $K = 8$ , and five simulations per analysis. **A.** Values of Delta K. **B.** Mean of  $[\text{Ln } P(K)]$ . **C.** Probability of assignment of individuals estimated for  $K = 3$ . **D.** Probability of assignment of individuals estimated for  $K = 5$ . Each individual is represented as a vertical bar, divided into colored segments that represent the degree of belonging to each group genetic. Each color represents a different genetic group and its assignment is independent for each value of K. REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.



**Fig. 3.** Alelos privados para los 21 marcadores microsatélites empleados en la caracterización genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental, 2015 – 2018. REC: Pico Caracas; TUR: Pico Turquino; BAY: La Bayamesa; GIG: El Gigante; GRP: Gran Piedra.  
**Fig. 3.** Private alleles for the 21 microsatellite markers used in the genetic characterization of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba, 2015 - 2018. REC: Pico Caracas; TUR: Pico Turquino; BAY: La Bayamesa; GIG: El Gigante; GRP: Gran Piedra.

**TABLA III**

**Comparaciones pareadas del índice de fijación ( $F_{ST}$ ) entre localidades de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental, 2015-2018**  
 REC: Pico Caracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.

**TABLE III**

**Paired comparisons of the fixation index ( $F_{ST}$ ) between localities of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba, 2015-2018**  
 REC: Pico Caracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.

Localidad	TUR	BAY	GIG	GRP
REC	0,115	0,168	0,229	0,290
TUR		0,089	0,158	0,267
BAY			0,128	0,245
GIG				0,206

## DISCUSIÓN

### Caracterización de los microsatélites

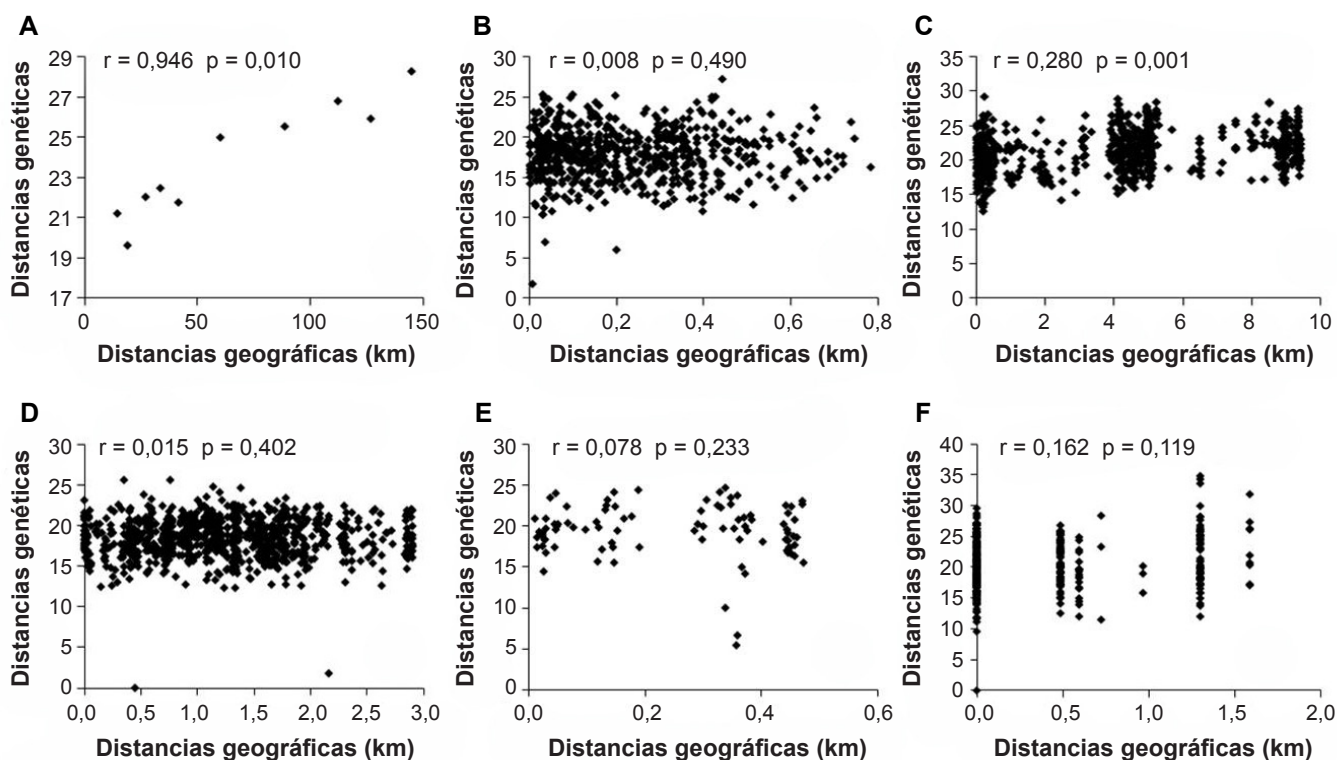
Según Waples (2015), en poblaciones donde los *loci* tienen desequilibrio genético, en promedio la  $H_o$  será menor que la  $H_e$  y el valor de  $F_{IS}$  será positivo y estadísticamente distinto de cero. Los parámetros expuestos anteriormente mostraron este comportamiento en 16 de los 21 marcadores microsatélites empleados. Por tanto, la existencia de un exceso de homocigóticos con respecto a la que debiera esperarse si la población estuviera en equilibrio, puede interpretarse de dos modos posibles:

(1) Debido a una elevada endogamia en la población, la cual está asociada, generalmente, con el tamaño de la población. *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* tiene tamaños poblacionales pequeños en casi todas sus localidades y presenta problemas en la regeneración natural (Molina-Peregrín & al. 2014, Testé & al. 2019). Sin embargo, según Waples (2015), la endogamia debería afectar a todos los marcadores por igual, por lo que encontrar que solo el 75 % de los *loci* están en desequilibrio permite descartar dicho fenómeno.

(2) Por una subdivisión geográfica interna, que permite la aparición de acervos genéticos diferenciados en la especie. Los diferentes acervos genéticos incluidos en una sola muestra representan poblaciones reproductivamente diferentes. El efecto de la subdivisión reducirá la heterocigosis observada, pero no afectará a la heterocigosis esperada (Godoy 2009). No obstante, esta situación no parece ser la causante del desequilibrio encontrado, dado que el análisis de equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó para cada una de las localidades de manera independiente, y ninguno de los resultados sustentan una subdivisión interna de las localidades muestreadas.

### Estructura genética

La prueba de asignación en el análisis de estructura presentó tres grupos genéticos con mayor probabilidad (Figura 2C), lo cual no se corresponde con las cinco localidades de las que se tomaron muestras. GIG y BAY, así como la mayoría de los individuos de TUR, constituyen un grupo genético, lo que se puede explicar por los bajos números de variantes alélicas privadas, al menos en dos de ellas. El grupo genético compuesto por estas tres localidades podría funcionar como mediador de la dispersión en la subespecie, dada su situación geográfica y, a su vez, contiene la mayor cantidad de individuos.



**Fig. 4.** Correlaciones de Mantel entre la matriz de distancias genotípicas codominantes lineales y la matriz de distancias geográficas, con 999 aleatorizaciones de los datos originales. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Mantel ( $r$ ) y la probabilidad asociada. **A.** Análisis entre todas las localidades de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental. **B-F.** Análisis por localidades: REC: Pico Caracas (B), TUR: Turquino (C), BAY: Pico Bayamesa (D), GIG: El Gigante (E), GRP: Gran Piedra (F).

**Fig. 4.** Mantel correlations between the linear codominant genotypic distance matrix and the geographic distance matrix, with 999 randomizations of the original data. The value of the Mantel correlation coefficient ( $r$ ) and the associated probability are shown. **A.** Analysis among all localities of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba. **B-F.** Analysis by locations: REC: Pico Caracas (B), TUR: Turquino (C), BAY: Pico Bayamesa (D), GIG: El Gigante (E), GRP: Gran Piedra (F).

**TABLA IV**

**Valores de probabilidad de deficiencia y exceso de heterocigosis ( $H_e$ ) determinada por las frecuencias alélicas, con respecto a la estimada bajo los modelos de Mutación de Alelos Infinitos (IAM), Mutación en Dos Fases (TPM) y Modelo Mutación por Pasos (SMM) para *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba oriental, 2015-2018**

REC: Pico Caracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra. El asterisco indica valores significativos de probabilidad ( $p < 0,05$ ).

**TABLE IV**

**Probability values of deficiency and excess of heterozygosity ( $H_e$ ) determined by allelic frequencies, with respect to that estimated under the Infinite Allele Mutation (IAM), Two-Phase Mutation (TPM) and Step Mutation (SMM) models for *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, eastern Cuba, 2015-2018**

REC: Pico Caracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra. The asterisk indicates significant probability values ( $p < 0.05$ ).

Modelo	REC		TUR		BAY		GIG		GRP	
	exceso $H_e$	déficit $H_e$	exceso $H_e$	déficit $H_e$	exceso $H_e$	déficit $H_e$	exceso $H_e$	déficit $H_e$	exceso $H_e$	déficit $H_e$
IAM	0,022*	0,981	0,152	0,856	0,040*	0,964	0,009*	0,992	0,152	0,856
TPM	0,534	0,483	0,823	0,188	0,284	0,729	0,209	0,804	0,794	0,216
SMM	0,993	0,007*	0,999	0,000*	0,853	0,156	0,671	0,335	0,985	0,016*

La similitud encontrada puede deberse a que las tres áreas protegidas son continuas y están en la parte más conservada de la Sierra Maestra, a pequeñas distancias geográficas. En estas tres localidades, aparecen individuos cuyo genotipo es una mezcla de distintos grupos genéticos. La existencia de individuos de TUR con mayor probabilidad de pertenecer al grupo genético predominante en REC puede deberse a dos factores: las pequeñas distancias geográficas entre ambas áreas protegidas (18,93 km) y el flujo genético desde TUR hacia REC, a través de árboles que tuvieron semillas que pudieran haberse dispersado y fundar el grupo de individuos de Pico Caracas.

La homogeneidad encontrada en los individuos de GRP, tanto para tres y cinco grupos genéticos (Figura 2), puede estar dada por su gran cantidad de variantes alélicas privadas. La débil mezcla con los otros grupos genéticos puede deberse a la baja efectividad de la dispersión por aves para la distancia geográfica existente, con respecto a otras localidades (menor distancia = 88,49 km). Según Veltjen & al. (2019), el ancestro de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* pudo haber llegado al oriente de Cuba desde La Española. Borhidi (1996) plantea que la colonización de la flora cubana puede haber seguido un patrón de oriente a occidente. Al tomar esto en consideración, GRP puede haber sido la primera localidad fundada por los ancestros de la subespecie y a partir de ahí pudo ocurrir una migración para el resto. Por tanto, ha estado más tiempo aislada y diferenciándose, lo que podría justificar el alto número de variantes alélicas privadas y que existan,

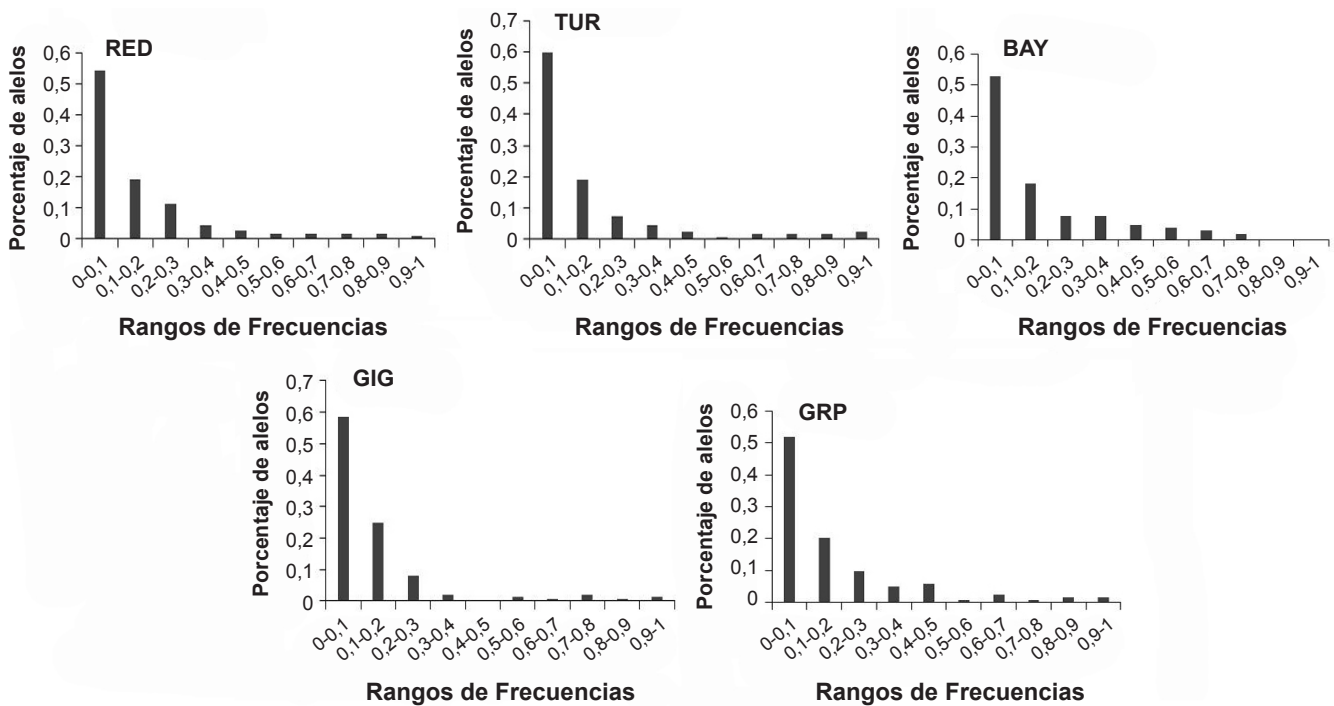
en el resto de las localidades, pequeños fragmentos de genotipos pertenecientes al grupo genético exclusivo de GRP.

**Diversidad genética por localidad y global**

Los valores promedios de heterocigosidad observada y esperada fueron superiores a lo reportado para *Magnolia cubensis* subsp. *acunae* (Hernández & al. 2020a) y los encontrados en *M. domingensis* Urb., *M. ekmani* Urb., *M. pallescens* Urb. & Ekman (Veltjen & al. 2019) y *M. sieboldii* K. Koch (Kikuchi & Isagi 2002). Sin embargo, fueron inferiores a los reportados para *M. hamorii* R. A. Howard (Veltjen & al. 2019).

El número promedio de alelos de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* fue ligeramente inferior que en *M. cubensis* subsp. *acunae*, debido a la gran cantidad de alelos raros y privados que se encontraron para la mayoría de los *loci*. Las principales diferencias entre ambos resultados podrían indicar que la diversidad genética en *M. cubensis* subsp. *cubensis* es superior a *M. cubensis* subsp. *acunae* (Hernández & al. 2020a), de forma global. No obstante, se debe tener en cuenta que el número de marcadores microsatélites utilizado en el presente estudio fue superior.

Por otra parte, los valores de diversidad encontrados por Veltjen & al. (2019) para *M. cubensis* subsp. *cubensis* fueron superiores a los hallados en la presente investigación. Las diferencias radican, principalmente, en que estos autores utilizan un número superior de marcadores (30 *loci*), a pesar de haber empleado solamente muestras de algunos individuos de TUR.



**Fig. 5.** Distribución del porcentaje de alelos por rangos de frecuencias para las localidades de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Sierra Maestra, Cuba, en el periodo 2015 - 2018. REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.

**Fig. 5.** Distribution of the percentage of alleles by frequency ranges for the localities of *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* in Sierra Maestra, Cuba, in the period 2015 - 2018. REC: Pico Carracas, TUR: Pico Turquino, BAY: La Bayamesa, GIG: El Gigante, GRP: Gran Piedra.

Las medidas de diversidad muestran que BAY es la localidad más diversa genéticamente, mientras que lo contrario ocurre en REC y GIG. Esto podría estar determinado, en cierto sentido, por la cantidad de individuos y el tamaño de muestra de cada localidad. BAY posee 307 individuos y un tamaño de muestra de 47, la segunda con mayor número de individuos y la primera en cuanto a su representatividad. Autores como Vergeer & al. (2003) demostraron que el tamaño poblacional se correlaciona positivamente con la heterocigosis observada, de ahí que aumente la diversidad genética. Además, el tamaño de la muestra puede tener un efecto significativo sobre la estimación de heterocigosis esperada en marcadores microsatélites (Poudel & al. 2014). Sin embargo, esto contradice lo que ocurre con TUR, pues, a pesar de ser la localidad con mayor número de individuos, presentó el menor valor de heterocigosis observada y el mayor coeficiente de endogamia. Una de las posibles explicaciones es que en esta región se han realizado, desde hace décadas, acciones de reforestación. La reforestación puede tener consecuencias adversas sobre una población cuando solo se siembran semillas de unos pocos ejemplares en grandes cantidades. De esta manera, se logra un incremento del tamaño poblacional, aunque no un aumento de la diversidad genética, lo que trae consigo un posible aumento en los valores de endogamia.

En localidades relativamente pequeñas con baja regeneración natural, el aumento de la autofecundación y el apareamiento entre individuos estrechamente relacionados pueden resultar en la endogamia y en la reducción del número de heterocigotos (Allendorf & al. 2013). La reducción de la variabilidad genética en plantas, debido a tamaños poblacionales pequeños, ya había sido reportada para *Succisa pratensis* Moench (Vergeer & al. 2003) y *Magnolia cubensis* subsp. *acunae* (Hernández & al. 2020a). Esto pudiera ocurrir en las localidades con tamaños poblacionales más pequeños (GIG, REC y GRP). En GIG, Molina-Peigrín & al. (2014) observaron poca regeneración natural, la cual también fue reportada por Testé & al. (2019) para GRP como una de las mayores amenazas del taxón. Por otra parte, el bajo número de individuos en estas localidades puede ser consecuencia de la tala ilícita (Molina-Peigrín & al. 2014, Ruiz 2017) a la que se ha visto sometida la subespecie. Según Rivers & al. (2016), la tala es una de las principales causas del decline de las poblaciones de magnolias a nivel mundial.

Entre las localidades estudiadas, se encontraron diferencias genéticas significativas con valores de  $F_{ST}$  elevados. Esto puede ser un reflejo de las distancias geográficas entre algunas localidades, como REC y GRP, o consecuencia de la diferencia en las frecuencias alélicas entre ellas. La fragmentación del hábitat y la pérdida de individuos son fenómenos que aumentan la diferenciación genética entre las poblaciones, a pesar de estar localizadas en un área geográfica reducida. Sin embargo, otros factores (tales como la capacidad de migración de la especie o la existencia de barreras geográficas o ecológicas) pueden ser los principales responsables de la diferenciación genética entre las poblaciones (Eguiarte & al. 2006). En tal sentido, los altos valores de  $F_{ST}$  detectados en

la subespecie (con una media de  $F_{ST} = 0,19$ ) demuestran que existe un bajo flujo genético.

En GRP se obtuvieron las mayores diferencias respecto al resto de las áreas para estos análisis. Dichos resultados coinciden con el análisis de alelos privados, donde GRP presentó el mayor número de variantes privadas, igualmente con la inferencia de la estructura genética. Imchanitzkaja (1991), en el tratamiento de la familia *Magnoliaceae* en Cuba, dividió a *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en: *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* restringida a la Cordillera de la Gran Piedra y *Magnolia cubensis* subsp. *turquinensis* Imkhan de la Cordillera del Turquino. La diferenciación morfológica detectada en aquel momento corresponde con los resultados obtenidos de la estructura genética y la diferenciación genética de los individuos de GRP con el resto de las localidades. La gran cantidad de variantes alélicas exclusivas de esta localidad puede deberse a la polinización por insectos. A su vez, la distancia geográfica puede ser una limitante para el o los dispersores y provocar un bajo flujo genético.

En ausencia de selección natural, el flujo genético constituye el primer determinante de la diferenciación genética entre las poblaciones. Consecuentemente, el flujo genético es una fuerza que retrasa, e incluso detiene, la diferenciación inter-poblacional y es un factor que actúa de manera inversa a la acción de la deriva genética (Eguiarte & al. 2006). Estas diferencias fueron corroboradas por la prueba de correlación de Mantel (Figura 4), la cual demuestra que existe dependencia entre las distancias geográficas y genéticas para la subespecie. En este sentido, la localidad de GIG presentó los menores valores de  $F_{ST}$  con respecto a GRP, lo cual podría funcionar como mediador de la dispersión.

#### Eventos de cuello de botella en localidades

Al aplicar la teoría de Courmet & Luikart (1996) y Luikart & al. (1998) para la detección de eventos de cuello de botella (Tabla III), se puede inferir que las localidades de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* no exponen signos de haberlos atravesado. El descriptor gráfico en forma de L, con elevado número de alelos con baja frecuencia, es el comportamiento esperado para poblaciones que no han sufrido estos eventos (Allendorf & Luikart 2007).

No obstante, la prueba de Wilcoxon ofrece diferencias estadísticas significativas bajo el IAM, (exceso de heterocigóticos) en REC, BAY y GIG. Sin embargo, la descripción teórica más apropiada del proceso de mutación de los microsatélites es el SMM (Putman & Carbone 2014), donde cada evento mutacional surge por la ganancia o pérdida de una unidad simple de repetición. Otras localidades mostraron un déficit de heterocigóticos significativo por el modelo SMM. Según Ruiz-García & al. (2007), el hecho de que exista déficit de heterocigosis calculada a partir del número de alelos, puede indicar que la población no se encuentra en equilibrio deriva-mutación, pero no es indicio de evento de cuello de botella. Otra posibilidad es que la población haya pasado por algún evento de cuello de botella ancestral y desde entonces

hayan permanecido de forma constante sus valores inferiores de heterocigosidad. Por tanto, según el modelo SMM, ninguna de las localidades evidencia signo de eventos de cuello de botella, porque no presentan diferencias significativas en el exceso de heterocigosidad.

### Implicaciones en la conservación

La variación genética a nivel poblacional permite la adaptación a los cambios ambientales (Allendorf & al. 2013) y asegura el éxito evolutivo de las especies a largo plazo. Por tanto, en las poblaciones que tienen baja diversidad genética como REC y GIG deben realizarse acciones inmediatas de reforzamiento. No obstante, en GRP se debe hacer también un reforzamiento, ya que a pesar de mostrar valores altos de diversidad genética presenta pocos individuos. De esta forma un aumento en el número de individuos se reflejaría en el aumento de la diversidad genética y de la capacidad de responder tanto a variaciones ambientales como a cambios en los objetivos de selección (Allendorf & Luikart 2007). BAY tiene los mayores valores de diversidad genética, y, a su vez, presenta un alto número de individuos, por lo que puede comportarse como una localidad distribuidora de semillas para el reforzamiento. TUR, a pesar de presentar el mayor tamaño poblacional, se caracteriza por valores muy inferiores de heterocigosidad observada, por tanto, no se recomienda utilizarlo para distribuir semillas a otras localidades.

Los resultados obtenidos reflejan una marcada estructura genética, por tanto, las localidades se pueden apreciar como subpoblaciones que han evolucionado independientemente (Newton & al. 2009), en este caso se perciben tres subpoblaciones: REC, TUR-BAY-GIG y GRP. Al realizar acciones de reforzamiento entre subpoblaciones, se va a interrumpir el proceso de evolución natural. Puede que dichas acciones tengan un impacto negativo en subpoblaciones con diferencias genéticas grandes como GRP y provocar depresión por exogamia (Edmands 2007). Sin embargo, cuando la baja diversidad y los pequeños tamaños poblacionales son una limitante para la supervivencia en una población, es necesario reforzar con individuos genéticamente distintos, para evitar la depresión por endogamia. Pues esta es capaz de conducir a la extinción local de la subespecie y, con ello, a la reducción de su área de distribución, lo cual puede ser aún más drástico desde el punto de vista conservacionista (Frankham & al. 2002, Eguarte & al. 2013).

Los ecosistemas donde se distribuye *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, han sido afectados por la deforestación y el desarrollo agroforestal, lo cual ha repercutido en sus categorías de amenaza (González-Torres & al. 2016). Autores como Molina-Pelegrín & al. (2014), Ruiz (2017) y Testé & al. (2019) alertan la necesidad de prestar atención a las amenazas que representa el efecto antrópico, la tala ilícita y la baja regeneración natural para *M. cubensis* subsp. *cubensis*.

Desde el 2008, existe el proyecto “Conservación de magnolias cubanas” que presenta como meta la protección y uso sustentable de las magnolias, para la recuperación y mantenimiento

de sus poblaciones. El plan de recuperación de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*, implementado desde hace algunos años, ha garantizado la inclusión de la subespecie como objeto de conservación en los planes de manejo de todas las áreas protegidas (Abad & González 2014, Santos & al. 2014, Carraza & al. 2017, Hernández & al. 2017, Sanfiel & al. 2017). Este, incluye un programa de propagación en microviveros y reforzamiento poblacional en La Platina perteneciente al Parque Nacional Turquino, en la localidad El Manguito del Parque Nacional La Bayamesa, en la Reserva Ecológica El Gigante y en la Estación Experimental Agronómica de Guisa.

Estas acciones, aunque válidas, se han realizado sin un resultado genético que las fundamente, es por ello que, sobre la base de los resultados del presente estudio, se sugiere tomar a BAY como dispensario de semillas para los viveros locales, reforzar con semillas a las poblaciones de REC y GIG, debido a su baja diversidad genética, y a la de TUR por mostrar valores tan bajos de heterocigosidad. A su vez, el reforzamiento en GRP es necesario debido al pequeño tamaño poblacional, acción que fue propuesta por Testé & al. (2019) al estudiar su estructura poblacional en esta área. Sin embargo, en GRP debe hacerse un reforzamiento de manera consciente y utilizar solamente individuos propios. El reforzamiento local no incluye la entrada de nuevos alelos o de otros que se encontraban en baja frecuencia en esta localidad, por lo cual no garantiza el aumento inmediato de la diversidad genética. Sin embargo, sí se logra un aumento a largo plazo de la diversidad debido a la recombinación y/o a la disminución del efecto de la deriva genética, el cual es más fuerte en poblaciones pequeñas. El reforzamiento es necesario, además, de los 60 individuos censados solamente uno es juvenil, lo que corrobora la baja regeneración natural reportada anteriormente por Testé & al. (2019).

Restaurar los hábitats, desarrollar conciencia y trabajar con las comunidades locales establece el punto de partida para lograr planes de conservación más efectivos, que se verán reflejados en el mejoramiento del estado de conservación de especies amenazadas de montaña como *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*. Por otra parte, estudios como el presente demuestran cómo la genética puede integrarse en la práctica conservacionista, tanto a nivel de conocimiento básico como de gestión.

### CONCLUSIONES

La población de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* mostró una estructura definida para tres grupos genéticos, lo que sugiere que podrían existir tres grupos demográficos: REC, TUR-BAY-GIG y GRP. El segundo grupo genético aparece como mediador de la dispersión en la subespecie dada su situación geográfica y el gran número de individuos. El grupo GRP se encuentra muy bien definido debido al gran número de variantes alélicas privadas y distancias genéticas grandes, con respecto a otras áreas. La diversidad genética fue mayor en BAY, respecto al resto de las localidades, e inferior en GIG y REC, lo cual se relaciona directamente con sus tamaños poblacionales. Algunas localidades muestran valores de

diferenciación genética elevados, asociado a sus distancias geográficas. La subespecie no presenta indicios de haber atravesado un evento de cuello de botella recientemente. Los altos valores de diversidad genética, número de individuos y ubicación geográfica de La Bayamesa ameritan el uso de plántulas de esta localidad para el reforzamiento del resto de las áreas, entre las que es probable la existencia de flujo genético.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Iniciativa Planta!, a la Sociedad Cubana de Botánica, a Whitley Fund for Nature, Fauna & Flora International, Fondation Franklinia, Wespelaar Arboretum, Instituto de Ecología, A.C., Magnolia Society International, Ghent University, Jardín Botánico Nacional de Cuba y al Centro Nacional de Áreas Protegidas, a la Estación del INAF de Guisa y al proyecto nacional "Recuperación del ecosistema de mangüa costera, manejo y conservación de especies forestales nativas en Matanzas y Granma, Cuba", por el apoyo. A todos aquellos que ayudaron durante el trabajo de campo, en especial a Yenía Molina, Adonis Sosa, Eldis R. Bécquer, Daryl Cruz Flores y Reinier Nuñez.

#### CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

M. Hernández, A. Palmarola, E. Testé, L.R. González-Torres y E. Veltjen diseñaron el estudio y desarrollaron el trabajo de campo y laboratorio. J. Quintana, M. Hernández y E. Testé procesaron los datos y escribieron el manuscrito. Todos los autores realizaron el análisis y discusión de los resultados, así como la revisión de las versiones del manuscrito.

#### CUMPLIMIENTO DE NORMAS ÉTICAS

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

**Aprobación ética:** Todos los autores han llevado a cabo el trabajo de campo y la generación de datos de forma ética, incluida la obtención de permisos adecuados.

**Consentimiento para la publicación:** Todos los autores han dado su consentimiento para publicar este trabajo.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abad, M.A. & González, A. 2014. Plan de Manejo de la Reserva Ecológica Pico Caracas. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), Cuba.

Allendorf, F.W. & Luikart, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Ltd., Malden, USA.

Allendorf, F.W., Luikart, G & Aitken, S.N. 2013. Conservation and the genetics of populations. Segunda Edición. Wiley-Blackwell, Oxford.

Borhidi, A. 1996. Phytogeography and vegetation ecology of Cuba. Akademiai Kaidó.

Carraza, M., Salazar, Y., Verdecia, J.L., Hernández, E., Ramón, A.D., Pérez, A., Espinosa, D., Labrada, P., Gonzalez, F. & Labrada, O. 2017. Plan de Manejo 2017-2021 del Parque Nacional La Bayamesa. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), Cuba.

Cires, E., De Smet, Y., Cuesta, C., Goetghebeur, P., Sharrock, S. Gibbs D., Oldfield, S., Kramer, A. & Samain, M.S. 2013. Gap analyses to support *ex situ* conservation of genetic diversity in *Magnolia*, a flagship group. *Biodivers. Conserv.* 22(3):567–590. <https://doi.org/10.1007/s10531-013-0450-3>

Cogollo, A., Calderón, E., Castaño, A., Devia, W., García, H., Toro, J.L. & Uribe, J. 2001. Plan de acción para la conservación de la familia *Magnoliaceae* en Colombia- Proyecto piloto. *Boletín Informativo Instituto Humboldt* 29: 1-4.

Cornuet, J.M. & Luikart, G. 1996. Description of power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Earl, D.A. & von Holdt, B.M. 2012. *Structure Harvester*: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour* 4(2): 359-361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

Edmunds, S. 2007. Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Mol. Ecol.* 16: 463-475.

Eguarte, L.E., Aguirre-Liguori, A.J., Jardón-Barbolla, L., Aguirre-Planter, E. & Souza, V. 2013. Genómica de poblaciones: nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución, México. *Revista Espec. Cienc. Quim. Biol.* 16(1): 42-56.

Eguarte, L.E., Souza, V. & Aguirre, X. 2006. Molecular Ecology. Instituto Nacional de Ecología, Semarnat, D.F., México.

Ellegren, H. & Galtier, N. 2016. Determinants of genetic diversity. *Revista Natural Genetica* 17: 422-433.

Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software *STRUCTURE*: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14: 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Frankham R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge. Editorial de la Universidad de Cambridge, Reino Unido.

Garner, B.A., Hoban, S. & Luikart, G. 2020. IUCN Red List and the value of integrating genetics. *Conservation Genet* 21(5): 795-801.

Godoy, J.A. 2009. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. *Ecosistemas* 18(1): 23-33.

González-Torres, L. R., Palmarola, A., González-Oliva, L., Bécquer, E. R., Testé, E., Castañeda, M., Colomé, A., Barrios, D., Gómez Hechevarría, J. L., García Beltrán, J. A., Granado, L., Berazaín, R. & Regalado, L. (Comp.). 2016. Lista Roja de la flora de Cuba. *Bissea* 10 (número especial 1): 33-283.

Greuter, W. & Rankin, R. 2017. Plantas vasculares de Cuba: inventario preliminar. Segunda edición, actualizada, de Espermatófitos de Cuba con inclusión de los Pteridófitos. Berlin: Botanischer Garten & Botanisches Museum Berlin; La Habana: Jardín Botánico Nacional, Universidad de La Habana.

Guo, S. & Thompson, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-371. <https://doi.org/10.2307/2532296>

Hartl, D.L., & Clark, A.G. 1997. Principles of Population Genetics, 3rd edn. Sinauer, Sunderland, MA.

Hernández, M. 2014. Identificación de las subespecies de *Magnolia cubensis* (*Magnoliaceae*) mediante análisis digital de imágenes de las hojas. *Revista Cub. Cienc. Biol.* 3(2): 53-60.

Hernández, M., Palmarola, A., Veltjen, E., Asselman, P., Testé, E., Larridon, I., Samain M.S. & González-Torres, R. 2020a. Population structure and genetic diversity of *Magnolia cubensis* subsp. *acunae* (*Magnoliaceae*): effects of habitat fragmentation and implications for conservation. *Oryx* 54: 451-459 <https://doi:10.1017/S003060531900053X>

Hernández, M., Testé, E. Simón, R., Palmarola Bejerano, A., González-Torres, R., & Molina, Y. 2020b. *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* – Hoja de taxón. *Bissea* 114 (NE 1): En prensa.

Hernández, P., Pérez, O., Labrada, P., López, P., Ramón, A. & Hernández, P. 2017. Plan de Manejo 2017- 2021 de Parque Nacional Pico Turquino. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), Cuba.

- Holleley, C.E. & Geerts, P.G. 2009. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *Biotech.* 46(7): 511-517. <https://doi.org/10.2144/000113156>
- Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. 2009. Inferring weak population Structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour* 9(5): 1322-1332.
- Imchanitzkaja, N.N. 1991. Rod *Magnolia* L. (*Magnoliaceae*) vo flore Kubj. *Novosti Sist. Vissh. Rast.* 28: 58-77.
- International Union for Conservation of Nature (IUCN). 2001. Categorías y criterios de la Lista Roja de la UICN: versión 3.1. Comisión de Supervivencia de Especies de la UICN. UICN, Gland, Switzerland y Cambridge, UJ.
- Jenkins, D.G., Care, M., Czerniewska, J., Fletcher, J., Hether, T. & Jones, A. 2010. A meta-analysis of isolation by distance: relic or reference standard for landscape genetics? *Ecography* 33: 315-320.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647-1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kikuchi, S. & Isagi, Y. 2002. Microsatellite genetic variation in small and isolated populations of *Magnolia sieboldii* ssp. *japonica*. *Heredity* 88: 313-321. <https://doi.org/10.1038/sj/hdy/6800047>
- Larridon, I., Walter, H.E., Guerrero, P.C., Duarte, M., Cisternas, M.A., Hernández, C.P. & Samain, M.S. 2015. An integrative approach to understanding the evolution and diversity of *Copiapoa* (*Cactaceae*), a threatened endemic Chilean genus from the Atacama Desert. *Amer. J. Bot.* 102(9): 1506-1520. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500168>
- Luikart, G., Allendorf, F.M., Sherwin, B. & Comuet, J.M. 1998. Distortion of allele frequency distribution provides a test for recent population bottlenecks. *Heredity* 89: 238-247.
- Molina-Pelegrín, Y., Santos-Chacón, W., Sosa-López, A., Arcia-Chávez, M., Hechevarría-Kindelán, O. & Rosales-Rodríguez, M. 2014. Estructura poblacional de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* en la Reserva Ecológica El Gigante. *Baracoa* 34(1): 1-9.
- Newton, A.C., Allnutt, T.R., Gillies, A.C.M., Lowe, A.J. & Ennos, R.A. 2009. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree* 14(4): 140-145
- Palmarola, A., González-Torres, L.R., Barrios, D., Albelo, N. & León, L. 2012. Proyecto de Conservación integral del "mantequero" en Guamuhaya. *Bissea* 6(2): 2.
- Palmarola, A., González-Torres, L.R., Hernández, M., Molina, Y., Gordillo, M., Granado, L. & Cruz, D. 2015. *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis*. *Bissea* 9 (número especial 4): 406-407.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. 2012. *GenAIEx* 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Poudel, R.C., Moller, M., Li, D.Z., Shah, A. & Gao, L.M. 2014. Genetic diversity, demographical history and conservation aspects of the endangered yew tree *Taxus contorta* (syn. *Taxus fuana*) in Pakistan. *Tree Genet. Genomes* 10: 653-665.
- Putman, A.I. & Carbone, I. 2014. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. *Ecol. Evol.* 4(22): 4399-4428. <https://doi.org/10.1002/ece3.1305>
- Raymond, M. & Rousset, F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evol.* 1280-1283.
- Rivers, M., Beech, E., Murphy, L. & Oldfield, S. 2016. The red list of *Magnoliaceae*. Revised and extended. Richmond (UK): Botanic Gardens Conservation International.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-50088286.2007.01931.x>
- Ruiz-García, M., Castillo, M.I., Álvarez, D., Gardeazabal, J., Borrero, L.M, Ramírez, D.M., Carrillo, L., Nassar F. & Gálvez, H. 2007. Estudio de 14 especies de primates platirrinos (*Cebus*, *Saimiri*, *Aotus*, *Saguinus*, *Lagothrix*, *Alouatta* y *Ateles*), utilizando 10 loci microsatélites: análisis de la diversidad génica y de la detección de cuellos de botella con propósitos conservacionistas. *Orinoquia* 11(2): 19-37.
- Ruiz, I. 2017. Las Áreas Protegidas de Cuba. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), La Habana, Cuba.
- Sanfiel, M., Abad, A., Acosta, G., González, A., Salmerón, A., Silot, M., Fagilde, M.C. & Álvarez, L.O. 2017. Plan de manejo del Paisaje Natural Protegido Gran Piedra 2017 – 2021. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), Cuba.
- Santos, W., Molina, Y., Arcia, M. & Sosa, A. 2014. Plan de manejo de 2014-2018 de Reserva Ecológica El Gigante. Centro Nacional de Áreas Protegidas (CNAP), Cuba.
- Simón, R. 2020. Análisis de la distribución y del nicho ecológico de *Magnolia* sect. *Talauma* en Cuba. Tesis de Diploma. Universidad de La Habana. Cuba.
- Testé, E., Gordillo, M., Palmarola, A., Hernández, M. & González-Torres, L.R. 2019. Estructura poblacional de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* (*Magnoliaceae*) en el Paisaje Natural Protegido Gran Piedra. *Revista Jard. Bot. Nac. Univ. Habana* 40: 19-2.
- Turchetto, C. Segatto, L.A., Mader G., Rodrigues, D.M., Bonatto, S. & Freitas, L.B. 2016. High levels of genetic diversity and population structure in an endemic and rare species: implications for conservation. *AoB Plants* 8: 002.
- Veltjen, E., Asselman, P., Hernández, M., Palmarola, A., Testé, E., González, L.R., Goetghebeur, P., Larridon, I. & Samain, M.S. 2019. Genetic patterns in Neotropical *Magnolias* (*Magnoliaceae*) using de novo developed microsatellite markers. *Heredity* 122: 485-500. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0151-5>
- Vergeer, P., Rengelink, R., Copal, A. & Ouborg, N.J. 2003. The interacting effects of genetic variation, habitat quality and population size on performance of *Succisa pratensis*. *J. Ecol.* 91: 18-26.
- Waples, R.S. 2015. Testing for Hardy-Weinberg proportions: have we lost the plot? *J. Heredity* 106(1):1-19. <https://doi.org/10.1093/jhered/esu062>
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evol.* 38: 1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Xin, Z. & Chen, J. 2012. A high throughput DNA extraction method with high yield and quality. *Plant Methods* 8(26): 1-7. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-26>