UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA, León
UNAN-León
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
"EDGAR MUNGUÍA ÁLVAREZ"

Estructura genética-espacial de *Calycophyllum candidissimum* (Vahl.) DC. (Rubiaceae) en Nicaragua mediante AFLP.

Trabajo monográfico para optar al título de
"Licenciado en Biología"

Autor:
Br. Alberto Dávila Lara.

Tutora:
Prof. Verónica Díaz PhD.

Asesores:
Prof. Hans Peter Comes PhD.
Prof. Andreas Tribsch PhD.
Matthias Affenzeller PhD.

Junio 30 del 2015
León, Nicaragua
Centroamérica



“Insanity is doing the same thing over and over again and expecting different results”.

Albert Einstein. German Theoretical-Physicist (1879-1955).

"*Cuando anhelamos una vida sin… dificultades, recuérdanos que los robles crecen con fuerza con vientos en contra y que los diamantes nacen bajo presión.*"

PETER MARSHALL.

En memoria de quien es mi inspiración:

MI ABUELO VALENTÍN LARA QUINTERO.
12 Dic. 1931 - 07 May. 2013.

A quienes me dieron la vida:
Mi madre **MA. EUGENIA LARA TORUÑO** y mi padre **PEDRARIAS DÁVILA PRADO**.

A quienes me regalaron otra oportunidad de vivir.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que contribuyeron en la realización de este trabajo:

Prof. *VERÓNICA DÍAZ* **PhD.** por su acompañamiento y profesionalismo durante este proyecto.

Prof. *WALTRAUD KOFER* **PhD.** del **DAAD** (Agencia Alemana de Intercambio Académico) y al **Prof.** *HERMAN SUIDA* **PhD.** de **Paris Lodron Universidad de Salzburgo**, Austria, quienes constituyeron una piedra angular para la realización de la pasantía de investigación y entrenamiento.

Prof. *HANS PETER COMES* **PhD.** y **Prof.** *ANDREAS TRIBSCH* **PhD.**, por compartir conmigo sus conocimientos y habilidades de alta calidad científica, a *MATTHIAS AFFENZELLER* **PhD.**, *ALEXANDER GAMISH* **PhD.** y *URSULA JAROS* **PhD.** por sus consejos y voces de alientos en la vida diaria del laboratorio.

MSc. *INDIANA CORONADO* del **Missouri Botanical Garden** por sus recomendaciones de campo y a **MSc.** *CARLOS MEJÍA* de la División de Biodiversidad del **MARENA**.

A Mi familia, en especial: *EUGENIO* y *BELÉN DÁVILA L., MAGALY* y *XAVIER LARA T., GREG SHEFF* y *SARAH BUTTREY,* mis abuelas *MERCEDES TORUÑO* y *ESTHELA PRADO*, quienes con cariño, paciencia y estímulo me acompañaron en los momentos de tensión y a mi abuelo ALEJANDRO DÁVILA.

Gracias a todos.

Lista de tablas

Tabla 1.	Condiciones naturales en la que se encuentra *C. candidissimum*.	**Pág. 16**
Tabla 2.	Posiciones geográficas de las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.	**Pág. 32**
Tabla 3.	Distancia euclediana entre pares de poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.	**Pág. 33**
Tabla 4.	Caracterización de las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.	**Pág. 34**
Tabla 5.	Análisis de valores de $\mathbf{F_{st}}$ entre pares de poblaciones de *C. candidissimum*.	**Pág. 51**
Tabla 6.	Valores de polimorfismo y diversidad genética en las trece poblaciones.	**Pág. 52**
Tabla 7.	Frecuencia de alelos en las poblaciones (AMOVA).	**Pág. 54**

Lista de figuras

Fig. 1.	Metodología para la técnica AFLP.	**Pág. 27**
Fig. 2.	Mapa de la distribución potencial de *Calycophyllum candidissimum* (Vahl.) DC.	**Pág. 29**
Fig. 3.	Mapa de la ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas.	**Pág. 30**
Fig. 4.	Parámetros ensayados para la selección del protocolo de extracción de ADN.	**Pág. 35**
Fig. 5.	Condiciones de ensayo para la normalización de metodologías de extracción del ADN.	**Pág. 37**
Fig. 6.	ADN extraído de *C. candidissimum* (Vahl) DC.	**Pág. 46**
Fig. 7.	Resultados de la técnica AFLP en *C. candidissimum.*	**Pág. 47**
Fig. 8.	Gráfica de la probabilidad de agrupamiento de las muestras.	**Pág. 49**
Fig. 9.	Análisis Bayesiano.	**Pág. 50**
Fig. 10	Prueba de Mantel.	**Pág. 53**
Fig. 11.	Esquematización de la estructura genética-espacial de las poblaciones de *C. candidissimum* en Nicaragua	**Pág. 63**
Fig. 12.	Actividades en la que se utiliza *C. candidissimum* en la cultura popular.	**Pág. 76**
Fig. 13.	Reconstrucción del ajuste geológico de la región y el arco volcánico centroamericano hace 6 Ma	**Pág. 76**
Fig. 14.	Proceso formativo geológico de Centroamérica.	**Pág. 76**
Fig. 15.	Ejemplo de límites de las provincias biogeográficas en la parte baja de Centroamérica.	**Pág. 77**
Fig. 16.	Esquema de la biodiversidad críptica y estructura filogeográfica en la zona baja de Centroamérica	**Pág. 77**
Fig. 17.	Metodología del transecto lineal y muestreo binario.	**Pág. 78**
Fig. 18.	Visión subjetiva de la importancia relativa del cambio de diferentes marcadores moleculares	**Pág. 78**
Fig. 19.	Gráficos de la fenología de *C. candidisimum* (Vahl.) DC.	**Pág. 78**
Fig. 20.	Localización de los individuos muestreados de *C. candidissimum* (Vahl.) DC y áreas de conservación de Nicaragua	**Pág. 79**
Fig. 21.	Procedimiento de generación de datos de AFLP para este estudio.	**Pág. 79**
Fig. 22.	Patrón de vientos alicios a través de Mesoamérica.	**Pág. 80**
Fig. 23.	Mapa del relieve montañoso de Nicaragua.	**Pág. 80**

Abreviaturas

µM	Micro molar
A.P.	Área protegida
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Siglas en inglés: amplified fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)
AMOVA	Análisis Molecular de la Varianza
pb	Pares de base
BSA	Siglas en inglés: bovine serum albumina (albúmina de suero bovino)
C_c	*Calycophyllum candidissimum*
CCB	Convenio para la Conservación de la Biodiversidad
CCH-Complex	Siglas en inglés: Condamineeae-Calycophylleae-Hippotideae Complex
CDB	Convención de Diversidad Biológica
Chaco	Chacocente
Cm	Centímetro
CTAB	Bromuro de Cetil-Trimetil Amonio
DAP	Diámetro a la Altura del Pecho
ddH_2O	Agua bidestilada
DMS	Sistema de coordenadas: grados, minutos y segundos
dNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfatos
***Eco*RI**	Endonucleasa de restricción de *E. coli* RY13
EDTA	Ácido atilendiaminotetraacético
ENB	Estrategia Nacional de Biodiversidad
FAM, VIC y NED	Fluorocromos; FAM: azul, VIC: verde y NED: amarillo
FAO	Siglas en inglés: food and agriculture organization of the united nations (Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura)
Fig.	Figura
F_{st}	Índice de fijación
g	Gramos
g	Unidad de medida para fuerza relativa de centrifugación
G	Globularia
GABI	Siglas en ingles: Great American Biotic Interchange (gran intercambio biótico americano)
GPS	Siglas en inglés: global positioning system (sistema de posicionamiento global)
G_{st}	Coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones
Ha	Hectárea
H_e	Heterocigosidad esperada
Ho	Grupo externo
IBS	Siglas en inglés: international biogeography society (sociedad Internacional de Biogeografía)
L	Litro
L	Estado de material vegetal: Hojas

LAE	Líneas de Acción Estratégicas
Le	León
m	Metro
M	Molar
Ma	Millones de años
MARENA	Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales
mg/ml	Miligramos/mililitro
Mg^{2+}	Ion magnesio
$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Mili molar
MOBOT	Siglas en inglés: missouri botanical garden (jardín botánico de missouri)
MS	Multi screen
***Mse*I**	Endonucleasa de restricción de *Micrococcus sp.*
msnm	Metros sobre el nivel del mar
N	Tamaño efectivo de la población
Na_2EDTA	Etilendiaminotetraacetato - sódico
NaCl	Cloruro de sodio
ND	No definido
negc	Control negativo
ng	Nano gramo
Nic	Nicaragua
nm	Nanómetro
N_m	Estimación del flujo de genes
^oC	Grados centígrados
OH	Hidroxilo u oxhidrilo
Omet	Ometepe
Osti	Ostional
P	Pulverizado
PCR	Siglas en inglés: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
pH	Potencial de hidrogeniones
plg	Pulgada
pmol	Pico mol
PNUD	Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo
PVP	Polivinilpirrolidona
Quia	Protocolo de Quiagen
R.B.	Reserva de biósfera
R.V.S.	Reserva de vida silvestre
RAPD	Siglas en inglés: random amplified polymorphic dna (amplificación aleatoria de ADN polimórfico)
RFLP	Siglas en inglés: restriction fragment length polymorphisms (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción)
RL	Restricción-Ligación
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo

SGS	Siglas en inglés: spatial genetic structure (estructura genética espacial)
Sn.	San
SNP	Siglas en inglés: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleótido único)
SSRs	Siglas en inglés: short sequences repeat (secuencias Simples Repetidas o microsatélites)
Sto.	Santo
T máxima.	Temperatura máxima
T media	Temperatura media
T mín.	Temperatura mínima
***Taq* polimerasa**	ADN polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus*
TBE	Tris-Borato-Edta
TE	Tris-Edta
t_m	Tasa de exogamia
Tris-HCl	2-Amino-2 (hidroximetil)-1-1-3-propanodiol
U	Unidad de enzima
UNESCO	Siglas en inglés: united nations educational scientific and cultural organization (organización de las naciones unidas para la educación, la ciencia y la cultura)
UTM	Sistema de coordenadas universal transversal de mercator
UV	Ultravioleta
WC	Siglas en inglés: within control (control dentro del plato)

Resumen

Nicaragua se encuentra entre los tres primeros países con las tasas más altas de deforestación en Latinoamérica y también la más alta de utilización excesiva del bosque en la región centroamericana. Debido a su proximidad a los centros urbanos más importantes del país, el bosque seco de Nicaragua se encuentra dramáticamente alterado, estimándose que persiste menos del 1% de este tipo de vegetación. Entre los árboles grandes y conspicuos de este bosque se encuentra *Calycophyllum candidissimum*. Esta especie es altamente utilizada como combustible y en ocasiones de modo ornamental. El presente estudio es de tipo experimental de corte transversal, los procedimientos se realizaron entre Junio del 2013 a Noviembre del 2014, en la Universidad de Salzburgo, Austria; con el propósito de determinar la estructura genética de las poblaciones de esta especie. Convendría utilizar estos resultados para maximizar las estrategias de conservación de ésta y otras especies con características ecológicas comunes. Las poblaciones muestreadas en base a su distribución geográfica fueron: Quilalí, Somoto, Virgen del Hato, El Sauce, A.P. Telica-Rota, A.P. Momotombo, León, Sn. Cayetano (NATURA), Sn. Lorenzo, Sto. Tomás, R.B. Isla de Ometepe, R.V.S. Chacocente-Rio Escalante, El Ostional. El muestreo se realizó siguiendo la técnica del transecto lineal. Se analizaron 220 individuos mediante la técnica de AFLP, con un error calculado en 1.16% producto de 226 marcadores. Como resultado del análisis Bayesiano, se formaron tres agrupaciones: Norte (Quilalí, Somoto, Virgen, El Sauce, Telica, Momotombo y León), Centro-Sur (NATURA, Sn. Lorenzo, Sto. Tomás, Ometepe y Chacocente) y Sur (Ostional). Se detectó un gradiente latitudinal de diversidad genética (aislamiento por distancia); resultando el grupo Sur con la mayor y el grupo Norte, la menor. Los índices de diversidad génica fueron moderados entre las trece poblaciones (aprox. 0.11); siendo El Sauce, Telica y Momotombo, las de menor con 0.010. La de mayor diversidad fue El Ostional con 0.15, ubicándose ésta en el límite superior de diversidad genética “moderada”. El valor obtenido de diferenciación entre poblaciones fue de 10.9% y dentro de éstas 89.1% (AMOVA). Estos datos coinciden con los de especies polinizadas por animales y dispersadas por el viento. Dado su comportamiento de diferenciación clinal, los planes de conservación deberían garantizar la interconexión de los parches de bosques, para garantizar el flujo génico entre estas poblaciones y fortalecer así el Corredor Biológico Mesoamericano.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN 1

II. OBJETIVOS 3

III. MARCO TEÓRICO 4

3.1. GÉNERO: CALYCOPHYLLUM. 4
1. Especie: Calycophyllum candidissimum (Vahl.) DC. 4
3.2. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DE LA FAMILIA RUBIACEA. 6
3.3. BOSQUE SECO. 6
3.3.1. Perturbaciones del bosque seco. 7
3.3.2. Sistemas de apareamiento de los árboles del trópico. 10
3.4. RECURSO GENÉTICO FORESTAL. 10
3.5. ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES. 11
3.5.1. Efecto del sistema de apareamiento en la diversidad genética. 14
3.6. BIOGEOGRAFÍA. 15
3.6.1. Historia biogeográfica de Mesoamérica. 15
3.7. MUESTREO POR TRANSECTO LINEAL. 16
3.8. FUNDAMENTOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES. 17
3.8.1. Principio de Hardy-Weinberg. 17
3.8.2. Frecuencias genotípicas en el principio de Hardy-Weinberg. 18
3.8.3. Cambio en las frecuencias alélicas y genotípicas. 18
3.9. MARCADOR GENÉTICO. 19
3.9.1. Tipos de marcadores genéticos. 20
3.10. HERRAMIENTAS Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR. 22
3.10.1. PCR: 22
3.10.2. Técnica de secuencias no específica: AFLP. 25
3.10.3. Electroforesis del ADN en geles de agarosa. 28
3.11. RANGO DE ERROR EN DATOS DE AFLP. 28

IV. MATERIALES Y MÉTODOS 29

4.1. SELECCIÓN DE POBLACIONES Y MÉTODO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS. 29
4.2. GENERACIÓN DE DATOS DE LABORATORIO. 34
4.2.1. ENSAYOS PARA LA NORMALIZACIÓN DEL ADN Y PRIMERS A UTILIZAR EN AFLPS. 354
4.2.2. Electroforesis de ADN genómico. 378
4.2.3. GENERACIÓN DE MARCADORES POR AFLP. 38
4.3. ANÁLISIS DE DATOS. 42

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: 44

5.1. DATOS DE CAMPO. 44
5.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y AMPLIFICACIÓN DE AFLP. 45
5.3. CÁLCULO DEL RANGO DE ERROR. 47
5.4. CÁLCULO PARA ESTIMAR LA ESTRUCTURA POBLACIONAL. 48
5.5. DIVERSIDAD Y MATRIZ DE DISTANCIA GENÉTICA. 51
5.6. PRUEBA DE MANTEL (AISLAMIENTO POR DISTANCIA). 52
5.7. DIVERGENCIA ENTRE POBLACIONES 54

VI. CONCLUSIONES: 64

VI. RECOMENDACIONES: 65

BIBLIOGRAFÍA 66

I. INTRODUCCIÓN

Calycophyllum candidissimum (Vahl.) DC. (Madroño) es una especie muy codiciada por las excepcionales cualidades de su madera para combustible, por ello es ampliamente utilizada en los hogares con escasos recursos económicos y en el proceso de quema y horneado en la producción artesanal de ladrillos de construcción y artesanías. También, la población Nicaragüense se identifica con esta especie ya que sus fragantes flores tienen uso ornamental en actividades religiosas locales (Cordero *et al*., 2003), las cuales se desarrollan en la primera semana del mes de diciembre y que coinciden con su etapa fenológica.

Entre los árboles grandes y conspicuos del bosque seco se encuentra *Calycophyllum candidissimum* (Madroño) a como lo describen Stevens *et al*., (2001). Estos autores, reportan que el bosque seco de Nicaragua (principalmente región del pacífico), se encuentra dramáticamente alterado debido a su proximidad a los centros urbanos más importantes del país, estimando que persiste menos de un 1% de ése tipo de vegetación.

El material heredable contenido dentro y entre las especies de árboles con valor económico, científico o social, constituyen los recursos genéticos forestales, según lo declarado por la FAO (2014). La variación genética, tanto inter como intra específica, tiene esencial importancia para reaccionar frente a los cambios del medioambiente, incluyendo los ocasionados por plagas, enfermedades y el cambio climático. Constituye la materia prima que garantiza la evolución, la selección y mejora genética (FAO, 2002).

Roa (2002) señala tres amenazas para los recursos genéticos forestales en Nicaragua: La primera ha sido la eliminación de la cubierta natural y/o la extracción selectiva de árboles para madera, leña u otros productos. La segunda, radica en el cambio de uso de la tierra para producción agropecuaria. A este respecto, el PNUD (2003) indica que Nicaragua a diferencia de los demás países centroamericanos duplicó su superficie de cultivo entre 1990 y 1995. Esto concuerda con lo reportado por Sevilla *et al*., (2004), que Nicaragua deforestó aproximadamente 117 mil hectáreas por año, lo que según el PNUD (2003) lo ubica entre los tres primeros países con las tasas más altas de deforestación en Latinoamérica (3,1- 5,2% por año). La tercera amenaza, son los incendios forestales, plagas y enfermedades y las quemas agrícolas (Roa, 2002).

En términos de conservación, la CDB ha estipulado que genes, especies y ecosistemas son los tres niveles primarios a considerar para obtener éxito en la

conservación de la biodiversidad (Bowen, 1999). Sin embargo, la variación genética generalmente no es incluida para implementar la CDB, (Laikre *et al.,* 2010). Al respecto, la FAO (2012) señala que en América Latina no existe un claro enlace entre acciones de conservación y los estudios de diversidad genética, por lo que recomienda generar proyectos de investigación que articulen los estudios genéticos y las actividades de conservación *in situ* y *ex situ* en cada país.

Con el avance de las ciencias y técnicas moleculares, actualmente es posible recurrir a la información genética (ADN) que antes no era asequible, permitiendo identificar unidades de conservación en base a la variación genético-poblacional y no solamente en dependencia de rasgos fenotípicos de las especies de interés (Godoy, 2009). En las últimas décadas se utilizan técnicas moleculares de fingerprinting basadas en el ADN, para analizar la diversidad genética. Una de ellas es el RAPD. En el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología de la UNAN-León, en Nicaragua, se ha utilizado RAPD para estimar la diversidad genética en especies nativas como *Sabala mexicana, Pinus tecunumanii, Cedrela odorata, Pachira quinata* y *Calycophyllum candidissimum*. En esta última especie, existe un estudio preliminar realizado por González & Olivares (2012), dado que se muestrearon pocas poblaciones y se obtuvieron pocos marcadores. Debido a ello, el presente trabajo incluye un área de estudio que cubre más del 80% de la distribución geográfica de *C. candidissimum* en el territorio nacional.

En esta investigación se utilizó la técnica AFLP; (Vos *et al.,*1995) por ser más robusta que los RAPD para realizar estudios de genética poblacional, con el propósito de comprender un poco más sobre la distribución, flujo e interconexiones que se están dando a nivel genético-poblacional en esta especie.

Diversos autores, Escudero *et al.,* (2003), Manel *et al.,* (2003), Holderegger *et al.,* (2010), Chan *et al.,* (2011) insisten sobre la importancia de que los marcadores moleculares se puedan vincular a los rasgos de adaptación clave y se empleen en combinación con los métodos geoespaciales y análisis del medio ambiente. Además, los resultados pueden ser utilizados en meta-análisis, para detectar patrones geográficos generales de la diversidad genética de especies con rasgos de historia de vida similares u otras analogías (Conord *et al.,* 2012). A la vez, pueden ser extrapolados, para proporcionar recomendaciones de conservación para otras especies de árboles que comparten características ecológicas comunes, pero para las que no existen estudios genéticos (FAO, 2014). Lo que permite maximizar la eficacia de las estrategias de conservación *in situ*, como lo menciona Petit *et al.,* (1998) y sean tomados en cuenta en las LAE de la ENB, como lo recomienda MARENA (2002).

I. OBJETIVOS

GENERAL:

Estimar los niveles de diversidad genética de poblaciones naturales de *C. candidissimum* en Nicaragua utilizando la técnica AFLP.

ESPECÍFICOS:

- Determinar la estructura genética de las poblaciones de *C. candidissimum* mediante análisis Bayesiano.

- Evidenciar las relaciones genéticas y su distribución en las poblaciones de *C. candidissimum*.

II. MARCO TEÓRICO

3.1. Género: *Calycophyllum*.

De acuerdo con Dessein *et al*., (2005), el género *Calycophyllum* es clasificado como parte del grupo: CCH-Complex (condamineeae-calycophylleae-hippotideae). Este mismo autor hace énfasis en la dificultad de delimitar a este complejo; sin embargo, Rova *et al*., (2002), sugieren que el género *Calycophyllum* pertenece a la tribu Ixoroideae; no obstante, sus relaciones con otros géneros del CCH-complex son desconocidos hasta que más datos estén disponibles, a pesar de eso, Dessein *et al.,* (2005) prefieren no subdividir el complejo en identidades más pequeñas. El género es neotropical con más de 15 especies y la mayoría en Suramérica (Stevens *et al*., 2001).

3.1.1. Especie: *Calycophyllum candidissimum* (Vahl.) DC.

La especie *C. candidissimum,* es un árbol de hasta 20 m de altura, glabrescentes con corteza exfoliante en placas, dejando un tronco variegado con castaño, blanco y a veces verde; planta hermafrodita. Hojas opuestas, elípticas, de 4 a 13 cm de largo y de 1.5 a 8 cm de ancho, ápice acuminado, base cuneada y atenuada, papiráceas; caducas, dejando un anillo de tricomas. Inflorescencias terminales paniculadas, redondeadas de 2 a 3 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho con pedúnculos de 1 a 3 cm de largo, fragantes; de 1 a 3 flores en cada címula con 1 lobo alargado (semáfilo), petaloide de 1 a 2.5 cm de largo y lámina oblonga de 2 a 4 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho redondeada, piperácea de coloración blanco verdosa; ovario 2-locular, óvulos numerosos. Frutos en forma de cápsulas septicidas, cilíndricas de 6 a 12 mm de largo y de 3 a 4 mm de ancho, leñosas; Semillas aplanadas fusiformes, piperáceas de 3 a 5 mm de largo y aladas (Stevens *et al*., 2001).

Con respecto a su ecología, Stevens *et al*., (2001) la describe como una especie frecuente de encontrar en bosques secos y estacionales. A su vez, Cordero *et al*., (2003) menciona que ésta forma parte del dosel superior del bosque seco tropical y las zonas de transición a bosque húmedo tropical. Datos de su ecología se resumen en la **tabla 1**. Según Stevens *et al*., (2001), el tiempo de floración de la especie va desde Septiembre a Enero y la fructificación es desde Enero a Abril. Ver en anexos **Fig. 19.**

Tabla 1. Condiciones naturales en la que se encuentra *C. candidissimum*

Clima y suelo en condiciones naturales		Preferencias	Factor limitante
Pluviometría	800-2000 mm	Zonas secas bajas	Crecimiento lento a medio.
Estación seca	3-6 meses		
Altitud	0-900 m		
T media anual	>26 ^{o}C		
Suelos	Desde calcáreos con buen drenaje hasta arcillosos mal drenados		
Textura	Media a pesada		
pH	Neutro a alcalino		
Drenaje	Bueno a impedido		
Pendiente	Plana a ondulada		

Aspectos ecológicos de la especie *C. candidissimum,* según Cordero *et al*., (2003). Con algunas modificaciones.

La distribución geográfica de la especie en el mundo abarca desde el centro de México, América Central y las Antillas hasta el noreste de Colombia y Venezuela (Stevens *et al*., 2001) y en Nicaragua, se encuentra distribuida en la zona del pacífico y centro del país (Cordero *et al*., 2003). Ver **Fig. 2**.

Según Kiehn (1995), esta especie tiene un juego de cromosomas de 2n = 34 lo que coincide con los registrados en otra especies pertenecientes al grupo Cinchoneae.

C. candidissimum es el árbol nacional de Nicaragua, según el decreto 1891 (Declaración del Congreso de Nicaragua, 1971).

Usos:

La especie *Calycophyllum candidissimum*, cuyos nombres comunes son: Madroño, Sálamo, Urraco y Lemonwood, ha sido reportado con propósitos de celebraciones religiosos a través de la historia, según Lorence (1999). Este autor, también sugiere que la especie es una buena fuente de recurso maderero para la construcción.

Sus flores blancas y llamativas emanan una fragancia dulce, según lo reportado por Croat (1978). En Nicaragua, la especie forma parte de las tradiciones y desde muchísimos años atrás, ya que sus flores y sus ramas son utilizadas como ornamentales para los altares de “La Purísima”, celebración

religiosa popular celebrada desde la época de la colonia. La floración, que ocurre en los meses de noviembre a enero, coincide con estas festividades. La madera también es utilizada en carpintería y ebanistería, elaboración de pisos de lujo, peines finos y palillos de dientes, mangos de herramientas agrícolas y en fabricación de flechas y otros artículos deportivos como cañas de pescar. Pero su principal uso es para producir carbón o alimentar como leña las cocinas tradicionales (Cordero *et al*., 2003).

Por otro lado, *C. candidissimum* ha sido reportado por Villegas *et al.,* (2003) como una planta melífera, pero no hay registros de ello en estudios melisopalynológicos. Sin embargo, Ramírez-Arriaga *et al.,* (2011) encuentran que el polen de esta especie fue clasificado como secundario (21.4%) en abejas poliflorales.

3.2. Biología reproductiva de la familia Rubiacea.

Esta familia se caracteriza por ser dioica o hermafrodita, a como lo reportan Bawa *et al.,* (1985). Las rubiáceas, son de las pocas especies del sotobosque que se consideran autoincompatibles; además, en este tipo de especies la probabilidad de incompatibilidad con el vecino más próximo es considerablemente alta, debido a la ocurrencia de sistemas multialélicos. Estos sistemas son importantes, si se considera que la compatibilidad entre individuos próximos, pueda en cierta medida reducir la base genética de la especie, comprometiendo su existencia a largo plazo (Kress & Beach, 1994). Bawa *et al.,* (1983) estudiaron 14 especies en la Estación Biológica La Selva (Costa Rica) y encontraron que 13 son autoincompatibles.

3.3. Bosque seco.

La definición más reciente propuesta por la red colaborativa de investigación TROPI-DRY (http://tropi-dry-eas.ualberta.ca), define a los bosques secos tropicales, como una formación vegetal dominada por árboles de hoja caduca tolerantes a la sequía (al menos el 50%), que crece en un clima donde la temperatura media anual es ≥25 ^{o}C, precipitación total anual entre 700 y 2000 mm y la presencia de tres a más meses secos de poca o ninguna lluvia. Según Sánchez-Azofeifa *et al.,* (2005), el porcentaje de árboles de hojas caducifolias varía de 50 a 100%, dependiendo del tipo de bosque y su ubicación a lo largo de un gradiente de precipitación.

Esta formación boscosa en Nicaragua, es un tipo de bosque deciduo de temperatura media a baja y se localiza en zonas secas, especialmente en Chinandega, León, Carazo, Rivas y Chontales (MARENA, 2000). Está compuesto principalmente por árboles de 20 a 25 m de alto, tiene un solo dosel bajo, los bejucos son poco comunes y de diversidad limitada, las epífitas son comunes pero de diversidad baja (Stevens *et al*., 2001). También está compuesto, por el bosque cálido de medio a sub deciduo y zonas semi húmedas, principalmente en la costa de Managua, la cuenca del Lago de Managua y parte de Boaco (MARENA, 2000).

Antes de la llegada del hombre, este tipo de vegetación fue abundante en la Zona Pacífico, en la actualidad se encuentra dramáticamente alterado. Hace miles de años la mayor parte del área con esta vegetación fue probablemente transformada para la agricultura y sustentó a una población amerindia grande en la época de la conquista española. Con el colapso de la población después de la conquista, la vegetación probablemente se recuperó de cierta forma, pero a medida de que la población volvió a aumentar gradualmente, especialmente en los últimos 50 años, la mayoría de los bosques fueron nuevamente talados para dar paso a los cultivos. Se estima que menos del 1% de éste tipo de vegetación persiste y prácticamente nada se encuentra en estado natural (Stevens *et al*., 2001).

3.3.1. Perturbaciones del bosque seco.

Existe una clasificación para catalogar los tipos de perturbaciones, estos son de dos tipos:

- Las alteraciones letales que incluye a los deslizamientos (Velázquez & Gómez-Sal, 2007).
- Las alteraciones sub-letales como las sequías (Ceccon *et al.,* 2006) y huracanes (Van Bloem *et al.,* 2006).

La capacidad de la tierra abandonada para regenerarse dependerá de la gestión pasada y de la historia de perturbación. Por tanto, la degradación relacionada con diferentes impactos humanos en el bosque se pueden clasificar en: estructurales y funcionales (Ashton *et al.,* 2001). Los cambios estructurales representan alteraciones en la composición, debido a la falta de fuentes de semillas o la imposibilidad de establecerse. El cambio funcional puede considerarse como más grave, debido a la alteración de la fertilidad real, la hidrología y la estructura del suelo y por lo tanto la productividad del sitio y potencialmente la capacidad de las especies nativas para adaptarse al sitio.

Los posibles efectos de una reducción de las poblaciones naturales de los bosques en Mesoamérica y su probable reducción alélica, pueden ser explicados por dos factores como lo indican Novick *et al.,* (2003) según lapsos de tiempo:

1. **A Largo plazo**: El tamaño efectivo de las poblaciones, en Mesoamérica puede ser considerablemente menor que en la Amazonía debido a las diferencias en la superficie terrestre y el hábitat adecuado, o a los cambios relativos del hábitat en el área como resultado del cambio climático histórico.
2. **A Corto plazo**: Como resultado de la alta tasa de deforestación en la región y siendo ésta la de mayor gravedad y duración en Mesoamérica en comparación con la del Amazonía.

La tala selectiva conduce a un aumento de la auto-fertilización y por consiguiente a una pérdida de la diversidad genética (Lee *et al.,* 2002) como se ha demostrado en otras especies maderables (Murawski *et al.*, 1994).

Pero Novick *et al*., (2003), no consideran a la fragmentación del bosque por factor antropogénico como una explicación convincente para la reducción de la diversidad genética. Ellos objetan esa teoría debido a los largos tiempos de generación en relación con el tiempo transcurrido con la deforestación, como es en el caso de *Swietenia macrophylla* (caoba de hojas grandes o caoba de Honduras). Estos mismos autores indican, que es poco probable que haya pasado suficiente tiempo como para que la deriva genética pueda haber causado una pérdida significativa de los alelos, en la mayoría de las poblaciones de caoba mesoamericanas; sin embargo, ellos mismo no descartan del todo este hecho.

Según la revisión bibliográfica que realizaron Lowe *et al.,* (2005), los árboles tropicales son particularmente vulnerables a los efectos de la degradación del hábitat, debido a sus características demográficas y reproductivas, incluyendo la baja densidad, los sistemas complejos de autoincompatibilidad, altos índices de exogamia (Cascante *et al.,* 2002) y las interacciones íntimas con los polinizadores y dispersores de semillas (Didham *et al.,* 1996; Dick *et al.,* 2003 y Ward *et al.,* 2005).

Siguiendo con la misma revisión de Lowe *et al.,* (2005), éstos autores encontraron varios reportes que resaltan las características particulares de la historia de vida de algunas especies de árboles (por ejemplo, el sistema de apareamiento, mecanismos de dispersión del polen y la semilla) que ayudan a mitigar la perdida de la diversidad en escenarios de post-fragmentación y perturbación de paisajes (Dick 2001 y White *et al.,* 2002).

Tanto Barrett & Kohn (1991) como Ellstrand & Elam (1993) aseveran que a raíz de las perturbaciones del hábitat, las poblaciones que quedan pequeñas por muchas generaciones sufren la pérdida de la diversidad alélica. Además de esto, los cuellos de botella extendidos que actúan sobre muchas generaciones, causarían la pérdida de alelos más comunes y conllevan a una severa reducción de la diversidad genética (Lande, 1988).

Con respecto a la degradación de los bosques en América Central, la tierra fue despejada inicialmente para la agricultura de subsistencia, los campesinos sin tierra expandieron la frontera agrícola (Sabogal, 1992; Sloan, 2008 y Calvo-Alvarado *et al.,* 2009) y los bosques de los alrededores fueron utilizados para leña (Sabogal, 1992). Sin embargo, Calvo-Alvarado *et al.,* (2009) mencionan que la mayoría de las áreas boscosas se despejaron para el establecimiento de pastos y que la extracción de madera resultó como el subproducto de la deforestación. En general, la deforestación dependió de dos factores: la fertilidad del suelo y la naturaleza de la topografía.

Posteriormente, años más tarde (década de 1940), se dio la introducción de pastos africanos exóticos para mantener sistemas de pastizales productivos para la cría de ganado. La persistencia de las especies introducidas han creado importantes barreras a la sucesión natural debido a competición de luz y los recursos del suelo (Nepstad *et al.,* 1996; Cabin *et al.,* 2002; Hooper *et al.*, 2002 y Griscom *et al.,* 2009).

Dick (2001) y Lowe *et al*., (2005) atribuyen a los efectos de la tala selectiva, la deforestación y la destrucción del hábitat, como los factores que repercuten en la densidad poblacional, estructura demográfica, fenología y abundancia, como también en la densidad y comportamiento de las comunidades de polinizadores. Por ejemplo, Ward *et al.*, (2005) en su recopilación encontró que Fuchs *et al,* (2003) descubrieron un aumento significativo de la tasa de autofecundación en *Pachira quinata* entre otras especies en hábitats perturbados que contenían bajas densidades de población de árboles reproductivos.

Amos y Balmford (2001) indican que de los dos problemas genéticos más amenazantes que enfrenta la disminución de las poblaciones (pérdida de la diversidad genética y la depresión por endogamia), la depresión por endogamia parece ser la más probable, por exacerbar el declive y acelerar la extinción y en particular si la reducción del tamaño de la población ha sido muy grande y en condiciones que son estresantes en lugar de benignas. En contraste, la pérdida de la variabilidad neutral se produce muy lentamente y la variabilidad “útil” probablemente se pierde más lentamente todavía.

Dick, (2001) y White *et al., (*2002) sugieren que características particulares de la historia de vida de algunas especies de árboles (por ejemplo el sistema de apareamiento, mecanismos de dispersión del polen y la semilla) ayudan a mitigar la perdida de la diversidad en escenarios de post-fragmentación y paisajes perturbados.

3.3.2. Sistemas de apareamiento de los árboles del trópico.

Según Baur y Schmid (1996), tanto en plantas como en animales la estructura y diversidad genética refleja en gran medida el sistema reproductivo de la especie.

Para Nason (2002) las especies del bosque tropical poseen características que promueven (y llevan a cabo), de manera eficaz, la polinización cruzada (exogamia) tanto a nivel de individuos como de población. Este mismo autor, menciona que hasta el momento los análisis genéticos realizados en los bosques neotropicales indican que la mayoría de las especies de árboles presentan una "tasa de exogamia" ($\mathbf{t_m}$) a nivel de varios loci superior al 80%. La tasa de exogamia se define como la relación entre la progenie (semillas) que es producto del polen procedente de plantas diferentes a la materna y aquella producida por el polen propio y se expresa tanto a nivel de individuo como a nivel de población. También señala, que aunque hasta ahora ninguna de las especies de árboles tropicales examinadas ha demostrado un sistema de apareamiento predominantemente autogámico, algunas de ellas parecieran "compatibilizar" con la autofecundación, pues presentan sistemas de apareamiento "mixto"; es decir, la cantidad de descendientes que producen por autofecundación es similar a la que producen por polinización cruzada. Finalmente, concluye que el análisis genético de los sistemas de apareamiento sugiere que en algunas especies, este comportamiento mixto podría obedecer a factores ambientales.

3.4. Recurso genético forestal.

La FAO (2014) define a los recursos genéticos forestales como el material heredable contenido dentro y entre las especies de árboles con valor económico, científico o social para las personas. Karp *et al*., (1997) manifiestan que la conservación y utilización de estos recursos son esenciales para el mantenimiento continuo y la mejora de la producción agrícola y forestal y por tanto, al desarrollo sostenible y la mitigación de la pobreza.

Según la FAO (2014), los objetivos de los estudios de conservación genética permiten conocer los niveles y patrones de diversidad genética, los impactos del uso de la tierra sobre la variación intra específica, la vulnerabilidad de las poblaciones a las amenazas, identificar las poblaciones que tienen alta prioridad y realizar diseños con enfoque a su conservación. De acuerdo a Karp *et al*., (1997), los propósitos de esta conservación es preservar la más amplia muestra de la diversidad genética existente de las especies con objetivos científicos y económicamente viables, incluyendo genes y genotipos.

Según la clasificación de la FAO (2014), los dos tipos de estrategias básicas que se utilizan para la conservación genética son: *In situ* (en el lugar) y *ex situ* (fuera del lugar, por ejemplo, bancos de genes, arboretums y jardines botánicos). Pero además menciona que otra opción la constituye *circa situm* (conservación en un ambiente antropogénico dentro del hábitat natural de la especie).

Godoy, (2009), menciona que al evaluar el estado genético de las poblaciones, se deben proponer medidas para preservar la diversidad genética y prevenir los riesgos de naturaleza genética para la persistencia de éstas. La FAO (2014) propone que para lograr esto de manera eficiente y segura, se debe conservar la mayor diversidad genética posible, incluyendo alelos raros y complejos de genes co-adaptados. Este mismo organismo recomienda que para las especies que exhiben variación clinal, la conectividad y el flujo genético entre las poblaciones se pueden mantener a través de corredores de vegetación y/o unidos por plantaciones *circa situm*.

Nicaragua goza de una flora cuantiosa gracias a su ubicación en el istmo de Centro América y a pesar de la destrucción del bosque durante las últimas décadas, el país aún posee recursos forestales significativos. Nuestra riqueza forestal es la suma de los genes desarrollados tras generaciones de reproducción de acuerdo con el proceso de selección natural. Por esta razón, el origen (procedencia) de una especie es muy importante para el silvicultor ya que a menudo existen grandes diferencias cualitativas y cuantitativas entre una y otra procedencia de la misma especie (MARENA-DANIDA, 1994).

3.5. Estructura genética de las poblaciones.

Eguiarte *et al*., (2010) definen como frecuencias alélicas; a la proporción de cada uno de los alelos en un gen dado, generalmente son diferentes entre las poblaciones que forman a una especie. Las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones constituyen la estructura genética. Una especie con alta estructura genética, es la que posee fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con

baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en sus frecuencias.

Este autor menciona que las diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones son consecuencia de las acciones de las fuerzas evolutivas a lo largo del tiempo, por eso reflejan la historia evolutiva de las poblaciones. La primera de estas fuerzas evolutivas es la selección natural que al adaptar a cada una de las poblaciones a sus condiciones locales, generalmente va a aumentar la diferenciación. La segunda es la deriva génica, la cual es un proceso azaroso que induce que se diferencien (que diverjan) las diferentes poblaciones de una especie y va a ser más importante entre más pequeñas sean las poblaciones (Hedrick, 2005 y Eguiarte, 2009). La tercera es la mutación que también incrementa la diferenciación genética, pero debido a que usualmente las tasas de mutación son muy bajas, su papel en generar diferenciación dentro de una especie es mínimo (Eguiarte *et al*., 2010).

Por último; este mismo autor señala que por el contrario el flujo génico, también llamado migración evita que diverjan las poblaciones al homogenizar las frecuencias alélicas. El flujo génico se define como la incorporación de genes a una poza génica provenientes de una o más poblaciones diferentes dentro de una especie. Así, éste funciona como una fuerza evolutiva cohesiva, manteniendo como un todo evolutivo a las especies y evitando que sean demasiado diferentes.

Allendorf *et al.,* (2013) opinan que la Estructura Genética Espacial (SGS) dentro de una población local depende tanto de la distancia de dispersión media de los genes, como de la densidad de la población. La extensión de la SGS se cuantifica normalmente utilizando estadísticos que estiman la autocorrelación espacial entre los genotipos a diferentes distancias de separación. La densidad de población y SGS pueden variar sustancialmente entre las poblaciones, si la distancia de dispersión se mantiene relativamente constante. Nason (2002) aduce que las especies con mayor potencial de dispersión de polen y semillas y con unidades de apareamiento más extensas, mantengan un nivel de diversidad genética relativamente alto ($\mathbf{H_e}$) y por ende, que el nivel de divergencia genética entre poblaciones ($\mathbf{G_{st}}$) sea relativamente bajo.

Con respecto a cómo se genera el flujo génico, Slatkin (1985) afirma que puede generarse por el movimiento de gametos, de semillas o de individuos. O en el caso de genomas, puede deberse a la incorporación a una población de genes nucleares o de genomas uniparentales, como el de la mitocondria o el cloroplasto. Durante un tiempo se pensaba que el flujo génico en general era muy restringido y de poca importancia evolutiva y que la selección natural era la fuerza evolutiva que mantenía unificadas (cohesivas) a las especies (Levin,

1981). Sin embargo, al estimar con métodos moleculares y ecológicos experimentalmente el flujo génico en distintas especies, se ha observado que los niveles pueden ser bastante altos (Rieseberg y Burke, 2001). De esta manera la migración puede actuar como una fuerza que mantiene cohesionadas a las especies (Piñero *et al*., 2008).

La importancia del flujo génico, tal como lo reporta Futuyma (1998), es un componente fundamental de la estructura poblacional, ya que sus patrones y niveles determinan hasta qué grado cada población de una especie es (o no) una unidad evolutiva independiente y la tasa de movimiento de genes de una población a otra puede determinar si la especie evoluciona al azar (por deriva génica) o responde de manera adaptativa (por selección natural) y así puede afectar de manera importante a la evolución de las especies. De igual forma Whitlock & McCauley (1999) consideran que el flujo génico puede determinar la persistencia y adaptación de poblaciones locales, las tasas de extinción de las poblaciones y especies, la evolución de los rangos de adaptación y distribución de las especies y de muchas propiedades ecológicas.

Si el flujo génico entre poblaciones de una especie es alto, entonces todas las poblaciones evolucionan de manera conjunta, pero si es muy bajo, las poblaciones de una especie empiezan a divergir y pueden evolucionar casi independientemente. Si continúa la diferenciación, puede llegar a surgir aislamiento reproductivo y en consecuencia el establecimiento de linajes evolutivamente independientes (o sea, se da un proceso de especiación). Qué tanto flujo génico es necesario para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de la intensidad de la otras fuerzas evolutivas (Slatkin, 1994 y Hedrick, 2005).

Eguiarte (2010) considera que la principal labor de la genética de poblaciones es entender las causas de la estructura genética, o sea las diferencias en las frecuencias alélica y que en términos generales, si se detecta que las poblaciones de una especie tienen una alta estructura genética, indica que los tamaños de las poblaciones han sido pequeños (o sea que se ha producido una intensa deriva génica) y/o que ha existido poco flujo génico (migración) entre estas poblaciones por mucho tiempo. La selección natural también puede causar las diferencias, pero se espera que sólo genere diferencias en los genes relacionados con las adaptaciones o en genes ligados a ellos.

Por lo general, las plantas leñosas del trópico mantienen una frecuencia de loci polimórficos y un nivel de heterocigosis esperada similar a la de sus homólogas en las zonas templadas, muchas de las cuales son gimnospermas exogámicas polinizadas por el viento y con poblaciones efectivas bastante grandes. Del mismo modo, tanto las especies del trópico como las de las zonas templadas

muestran un estimado de $\mathbf{G_{st}}$ y de $\mathbf{N_m}$ similar, lo que señala una divergencia genética moderadamente baja entre poblaciones (Nason, 2002).

Frankham *et al.,* (2002) consideran que las especies en peligro por lo general tienen niveles más bajos de diversidad genética que las especies no amenazadas. La variación espacial en la composición genética depende fundamentalmente de las tasas de flujo de genes, los tamaños de población y la selección. Típicamente las grandes poblaciones muestran un cambio insignificante en la diversidad genética a lo largo de decenas de años. Por el contrario, las poblaciones pequeñas suelen perder diversidad genética rápidamente con el tiempo.

3.5.1. Efecto del sistema de apareamiento en la diversidad genética.

Nason (2002) indica que en términos generales, se espera que un grado de exogamia alto, sumado a una capacidad de dispersión de polen también alta, resulte en un mayor flujo genético entre poblaciones y en una menor tasa de deriva genética. Por ende, las especies exogámicas, deberían mostrar una diversidad genética intrapoblacional ($\mathbf{H_e}$) mayor que las especies autógamas y por ende, una diferenciación genética interpoblacional ($\mathbf{G_{st}}$) menor.

Hamrick *et al.,* (1992) utilizaron los datos de 322 taxones leñosos para medir la diversidad genética dentro de cada especie, como también dentro y entre las poblaciones de éstas. Las especies leñosas con amplia distribución geográfica, sistemas de apareamiento cruzado, y que la dispersión de las semillas está dada por viento o por haber sido ingeridas por animales, presentan una mayor diversidad genética dentro de las especies y poblaciones con respecto a las especies con otras formas de vida, pero una menor variación entre las poblaciones. Estos mismos autores, concluyen que la historia evolutiva específica de cada especie debe desempeñar un papel importante en determinar el nivel y la distribución de la diversidad genética.

Nason (2002) ha encontrado que la diversidad genética a nivel de población y de especie (determinada mediante aloenzimas) es mayor en aquellas especies leñosas polinizadas por animales o por viento y que presentan sistemas de apareamiento exógamos, que en las especies que poseen sistemas de apareamiento “mixto”.

3.6. Biogeografía.

A como lo describen Losos & Ricklefs (2009), fueron Robert MacArthur y Edward Wilson quienes sentaron las bases de la teoría de biogeografía con su libro: “The Theory of Island Biograpgy” publicado en 1967. De acuerdo a la IBS, siglas en inglés: International Biogeography Society (2008), define a esta ciencia como un campo dinámico que busca comprender el papel de los factores históricos de la biodiversidad y el desarrollo de las capacidades predictivas, para medir cómo la biodiversidad responderá a nuestro mundo que cambia rápidamente. Según Codron (2011), la biogeografía es a la vez descriptiva e interpretativa y persigue la explicación de la repartición de los seres vivos en sus distintos tipos de agrupaciones o categorías: especies, hábitats, ecosistemas, biomas, paisajes, etc. Además, la biogeografía tiene una importante vertiente aplicada asociada a la ordenación del territorio y al manejo de los hábitats y las especies.

De acuerdo con la tradición académica y con la clasificación propuesta por la UNESCO (250501), la biogeografía se integra dentro de la geografía física aunque también interesa a la biología; apoyándose en conocimientos procedentes de especialidades en botánica, zoología, edafología y otras ciencias de la naturaleza (Codron, 2011). Este mismo autor, alude que en todo caso, se trata de una disciplina de carácter transversal que ocupa una posición “puente” entre las ciencias naturales y el resto de la geografía. Hengeveld (1992) añade que esta disciplina no solo describe los patrones geográficos y procesos ecológicos históricos, sino que también los ubica en un contexto evolutivo.

3.6.1. Historia biogeográfica de Mesoamérica.

Tradicionalmente se ha sabido que GABI marcó el desarrollo de un corredor terrestre a través de la región de Panamá, hace aproximadamente 3,0 Ma, según Marshall *et al*., (1979 y 1982). Además, Woodburne (2010) afirma que el clima fue el control primario para el inicio de GABI (2.6 a 2.4 Ma) y el posterior desarrollo de éste; ya que un clima glacial impulsaría las condiciones de sabana en la región del istmo de Centro América, en contraste con las selvas tropicales del Pleistoceno interglacial (y actuales) en Suramérica. En esas condiciones, es más plausible que la región ístmica albergara un ecosistema tropical, por lo menos hasta hace alrededor de 2,7 Ma, cuando los principales episodios de la glaciación del hemisferio norte comenzaron.

Piperno (2006) caracteriza al clima Neotropical del Pleistoceno de tierras bajas como sustancialmente más seco y frío que en la actualidad, resultado de una

peculiar combinación de: bajas temperaturas, bajas precipitaciones y bajas emisiones de CO_2 atmosférico.

Basado en el ejemplo de la estructura filogenética de *S. globulifera*, Dick *et al*., (2003) aducen el posible papel que jugaron las montañas y el clima en la promoción de su estructura, la colonización de la especie en los restos del archipiélago (que posteriormente formaría Centro América) podrían haber diferenciado a las poblaciones establecidas antes de la subida del puente de tierra intercontinental hace aproximadamente 3.1-3.5 Ma (Gentry, 1982).

Morley (2000) y Davis *et al.,* (2005) citados por Dick & Heuertz (2008), afirman que los bosques tropicales se remontan a la época del Cretácico y que éstos se han mantenido relativamente estables a través de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno. Tanto Colinvaux *et al*., (1996) como Fine & Ree (2006) aseguran también que incluso desde tiempos más tempranos; lo que proporciona tiempo suficiente para la divergencia a través del proceso de aislamiento por distancia descrito por Wright (1943). Además, es sabido por Janzen (1967) que las plantas tropicales de tierras bajas son fisiológicamente sensibles a un leve estrés de la sequía y el frío, sobre todo al enfriamiento de la temperatura asociada con el aumento de las elevaciones. Esta combinación de factores podría promover un gradiente latitudinal con una fuerte estructura filogeográfica en plantas tropicales (Martin & McKay, 2004).

Analizando los bosques desde el aspecto biogeográfico, Novick *et al.,* (2003) encontraron un nivel moderado de estructura genética en las poblaciones de caoba de Mesoamérica. Además, mencionan que los datos de los cloroplastos y la divergencia en ADN mitocondrial (aún no publicados) entre las poblaciones de caoba de Centroamérica, indican un establecimiento de estas en épocas más tempranas que la formación del puente de tierra de Panamá.

En diferentes estudios filogeográficos (procesos biogeográficos en linajes) se han encontrado formaciones de provincias biogeográficas, endemismo y quiebres en la parte baja de Centroamérica. Ver anexos **Fig. 15 y 16**.

3. 7. Muestreo por transecto lineal.

González (2006) propone que la mejor estrategia de muestreo para áreas abiertas es la del transecto lineal; la que se fundamenta en un recorrido lineal pero que no significa línea recta. Tiene la ventaja de que posibilita un recorrido amplio de la zona por lo que cubre los gradientes espaciales presentes, y con ello, se incrementa la observación de especies. En la metodología del transecto lineal, como primera medida, se define un recorrido aleatorio sobre la comunidad o unidad de paisaje bajo estudio, el cual por conveniencia puede

ser un sendero ya existente. De no contarse con el mismo, se define éste con marquillas visibles o se tiene claramente establecido un recorrido con puntos geográficos visibles (árboles, rocas u otros) o con ayuda de una brújula. El recorrido queda entonces preestablecido y, si es el caso, señalado, antes de dar inicio al muestreo. Posteriormente, se fija la distancia máxima de observación a lado y lado del transecto, la cual debe ser adecuada para visualizar e identificar los organismos a todo lo largo del recorrido. Definido lo anterior, se procede a hacer el recorrido de muestreo y se anotan todos los individuos avistados a lado y lado del transecto hasta la distancia máxima establecida.

Este mismo autor, sugiere que el método de distancia en transectos lineales puede también ser empleado en organismos sésiles con muy bajas densidades (plantas o animales), en los cuales no es práctico la aplicación de los procedimientos de distancia para organismos sésiles, dados los extensos recorridos que tendría que hacer el investigador buscando el individuo más próximo a cada punto aleatorio. Ver anexos **Fig. 17**.

3.8. Fundamentos de genética de poblaciones.

Cavers *et al.,* (2003) definen a una población como grupos de árboles pero dentro de un área geográfica coherente, de manera que están en contacto potencial reproductivo.

Algunas características de las poblaciones son: crecer dado que son entes dinámicos, expandirse o disminuir y contraerse mediante cambios en las tasas de nacimiento o mortalidad. Esto tiene consecuencias importantes y con el tiempo y pueden dar lugar a cambios en la estructura genética de la población. El conjunto de informaciones genéticas que llevan todos los miembros de una población, se denomina acervo genético. Para un locus dado, este acervo incluye todos los alelos de dicho gen que están presentes en la población. En genética de poblaciones la atención se centra en la cuantificación de las frecuencias alélicas y genotípicas en generaciones sucesivas. Los gametos producidos en una generación dan lugar a los cigotos de la generación siguiente. Esta nueva generación tiene un acervo génico reconstruido, que puede diferir de la generación anterior (Cabrero & Camacho, 2002).

3.8.1. Principio de Hardy-Weinberg.

Allendorf *et al.,* (2013) refieren que el modelo propuesto por Hardy y Weinberg, toma como precepto la estructura fundamental de una población mendeliana de

organismos con reproducción sexual. Además se consideran las siguientes suposiciones entre otras:

- Apareamiento aleatorio (población panmíctica).
- No mutaciones.
- Gran tamaño de la población.
- No influencia por selección natural.

Según Hedrick (2011) en ausencia de factores que pueden cambiar la frecuencia alélica (selección, deriva genética, mutación, y el flujo de genes) y ante el apareamiento al azar continuo, la proporción genotípica de Hardy-Weinberg no va a cambiar con el tiempo. En este caso se toma como ejemplo una población en la que se segregan dos alelos A_1 y A_2, en un locus autosómico *A* en frecuencias de *p* y *q* ($p + q = 1$) respectivamente, suponiendo que tanto los gametos de la hembra como los del macho se unen al azar para formar el cigoto.

3.8.2. Frecuencias genotípicas en el principio de Hardy-Weinberg.

Para caracterizar la diversidad genética en las poblaciones, se utilizan las frecuencias de alelos, las de los loci individuales y la heterocigosis. Fontdevila & Moya (1999) definen al polimorfismo como el porcentaje de loci variables. Se establece que un locus es polimórfico si el alelo más frecuente no supera el 95% (o el 99% aunque menos estricto).

La composición genética de una población por lo general se describe en términos de frecuencias de los alelos como el número de alelos y heterocigosidad. La heterocigosidad es la medida más utilizada para caracterizar la diversidad genética de loci únicos. La probabilidad de que un gameto portador A_1 fecunde a un huevo que lleva el mismo alelo, para producir un cigoto A_1A_1, es $p \times p = p^2$ y la probabilidad de que un gameto A_2 fecunde a un huevo A_2, para producir un cigoto A_2A_2 es, asimismo, $q \times q = q^2$. Los cigotos heterocigotos se pueden producir de dos maneras, por lo tanto su frecuencia esperada es $2 \times p \times q = 2pq$. En consecuencia, las frecuencias esperadas de los cigotos A_1A_1, A_1A_2 y A_2A_2 son p^2, $2pq$ y q^2, respectivamente (Frankham *et al.,* 2002).

3.8.3. Cambio en las frecuencias alélicas y genotípicas.

En una población panmíctica y suficientemente grande, ésta se mantiene estable con respecto a las frecuencias alélicas y genotípicas. Sin embargo,

existen algunos procesos que cambian estas frecuencias. Son de dos tipos según Cabrero & Camacho (2002):

- Procesos “direccionales”: Cambian las frecuencias de forma predecible en cantidad y dirección (las poblaciones se consideran de tamaño infinito). Se analizan:
  - Migración.
  - Mutación.
  - Selección natural.
- Procesos “dispersivos”: que se dan en poblaciones pequeñas por efecto de muestreo. En este caso los cambios de frecuencia son predecibles en cantidad, pero no en dirección. Se analizan los efectos de:
  - Deriva genética.
  - Consanguinidad.

3.9. Marcador genético.

Según Vicente *et al.,* (2003) un marcador genético es un carácter cuantificable que puede detectar variación ya sea en una proteína o en una secuencia de ADN. Es posible que un carácter genético no tenga efectos observables en el comportamiento de un individuo. A veces, sin embargo, este carácter puede estar ligado a otros caracteres (o correlacionado con ellos) que son más difíciles de medir y afectan, ciertamente, el comportamiento del individuo. En tales casos, estos caracteres genéticos no observables pueden usarse como marcadores genéticos de caracteres que están ligados a ellos, porque indican indirectamente la presencia de una característica de interés (o en estudio).

Todas las actividades de conservación de recursos genéticos exigen la caracterización de la diversidad, tanto en los acervos genéticos como en los bancos de germoplasma. En el primer caso, esto suele implicar la descripción de la variación de los rasgos morfológicos, particularmente características morfológicas de interés agrícola. Este enfoque tiene ciertas limitaciones: caracteres de alta heredabilidad y a menudo muestran poca variación en la mayor parte del material estudiado. La información genética proporcionada por caracteres morfológicos también es a menudo limitada. Estas limitaciones han dado como resultado el despliegue de las técnicas bioquímicas tales como la isoenzimas, la electroforesis de proteínas y las técnicas moleculares que analizan polimorfismo a nivel del ADN directamente. La Caracterización de los rasgos morfológicos sin embargo, no puede ser sustituida por cualquiera de las técnicas moleculares. Los resultados de los estudios moleculares o bioquímicos deben considerarse como un complemento a la caracterización morfológica (Karp *et al.,* 1997).

La medida de la variabilidad tiene un interés en sí, independiente de su valor adaptativo. Las poblaciones no sólo están sujetas a la selección, sino que su dinámica depende de relaciones de parentesco y parámetros demográficos. La cuantificación inter e intrapoblacional y el seguimiento generacional de las variantes genéticas permite describir, muchas veces, la historia y el escenario de actuación de las poblaciones, algo que resulta fundamental para entender la dinámica evolutiva de las mismas (Fontdevila & Moya, 1999).

Estudios de la genética en conservación se ha incrementado en los últimos años por la aparición de nuevos marcadores moleculares, el uso de muestras degradadas o antiguas, y por los avances en los métodos de análisis de datos. En particular, el salto a una escala genómica promete salvar la tradicional limitación impuesta por la naturaleza predominantemente neutral de la variación explorada con los marcadores moleculares tradicionales y permite acceder a la base genética de la variación adaptativa. No obstante, la superación de este y otros retos pendientes requerirá un mayor nivel de interacción entre enfoques empíricos, teóricos y experimentales, y entre las disciplinas de la genética y la ecología. La probada importancia de la variación genética para la persistencia de las especies y la sustancial contribución de las técnicas genéticas a la práctica conservacionista demandan una mayor presencia de la genética en la conservación de especies, tanto en sus aspectos normativos como de gestión (Godoy, 2009).

3.9.1. Tipos de marcadores genéticos:

Morfológicos:

Tradicionalmente, la diversidad que existe dentro y entre las poblaciones se ha determinado mediante la evaluación de sus diferencias morfológicas. Estas medidas tienen la ventaja de que son fácilmente realizables, no requieren de un equipo sofisticado y son la apreciación más directa de un fenotipo, están sujetas a cambios debidos a factores ambientales, pueden variar en las diferentes etapas del desarrollo de las plantas, y su número es limitado (Vicente *et al.,* 2003).

Proteicos o bioquímicos:

Para superar las limitaciones de los marcadores morfológicos, se han desarrollado otros tipos de marcadores, tanto a nivel proteico (del fenotipo) como a nivel del ADN (del genotipo). Los marcadores proteicos se conocen también como “marcadores bioquímicos” aunque se les incluye equivocadamente, y cada vez con más frecuencia, en una clase común bajo la denominación de “marcadores moleculares”. Los marcadores proteicos

(proteínas de almacenamiento de la semilla e isoenzimas) se obtienen mediante electroforesis, aprovechando las propiedades migratorias de las proteínas, sobre todo las enzimas, y se detectan mediante tinciones histoquímicas específicas de las enzimas que se quieren analizar. La detección de polimorfismos proteicos es una técnica que comparte algunas de las ventajas de los marcadores morfológicos. Sin embargo, los marcadores proteicos están también limitados por la influencia del ambiente y de los cambios que ocurren en las diferentes etapas del desarrollo. Aun así, los isoenzimas son un complemento robusto del análisis morfométrico sencillo de la variación (Vicente *et al.,* 2003 y Alcántara, 2007).

De ADN o moleculares:

Los polimorfismos del ADN pueden detectarse en el ADN nuclear y en el ADN de los organelos; éste último se encuentra en las mitocondrias y en los cloroplastos. Los marcadores moleculares afectan a la molécula de ADN como tal y se consideran, por ello, medidas objetivas de la variación. No están sujetos a las influencias ambientales, las pruebas con ellos pueden realizarse en cualquier momento del desarrollo de las plantas, y tienen el potencial de hallarse en número ilimitado porque abarcan todo el genoma, lo que representa su mejor atributo. Hay muchos tipos diferentes de marcadores moleculares y cada uno tiene propiedades diferentes (Vicente *et al.,* 2003 y Alcántara, 2007).

Schlötterer (2004) explica que en menos de medio siglo, los marcadores moleculares han cambiado totalmente nuestra visión de la naturaleza y en el proceso se han evolucionado a sí mismos. Sin embargo, todos los métodos moleculares desarrollados a lo largo de los años para detectar la variación, lo hacen en una de las tres clases conceptuales de marcadores únicos: variantes de proteína (aloezimas), polimorfismo de secuencia de ADN y variación repetida de ADN. A través de los años, los avances en biología molecular han conducido a la introducción de muchos nuevos tipos de marcadores moleculares. La opinión general es que el ascenso y la caída de la popularidad de diferentes tipos de marcadores (**Fig. 18**) reflejan la mejora continua en la forma en la que ensaya la variación genética.

A este respecto, Allendorf *et al.,* (2013) señalan que se debe recordar que no existe la "mejor" técnica universal. La mejor técnica para examinar la variación genética depende tanto de la pregunta que se hace, el grado y tipo de información genética disponible para la especie en cuestión.

3.10. Herramientas y técnicas de biología molecular.

3.10.1. PCR:

Hoelzel & Green (1998) señalan el impacto que ha tenido la PCR ya que se ha convertido en uno de los pilares de la biología molecular y en las investigaciones de genética poblacional en el breve tiempo transcurrido desde su invención por Mullis & Faloona (1987). Con esta técnica, segmentos definidos de ADN se pueden amplificar a cantidades de microgramos a partir de muy poca cantidad ADN de interés. Estos mismos autores enfatizan que aunque el procedimiento es en algunas formas aparentemente simple, la reacción puede implicar interacciones bioquímicas complejas.

Anteriormente, la utilización de la secuenciación en estudios poblacionales y evolutivos estaba limitada por la disponibilidad de secuencias homólogas de ADN en distintos organismos, que debían aislarse y amplificarse *in vivo* mediante procedimientos laboriosos de clonaje. La amplificación por PCR que utiliza aparatos de amplificación programables (termociclador), ha hecho más factible el estudio del polimorfismo del ADN (Fontdevila & Moya, 1999).

Huertas (2004), Pérez de la Vega (1997) y Azuard (2007) recapitulan sobre el método de la amplificación realizada por una enzima termoestable, generalmente la *Taq* polimerasa que es extraída de *Thermus aquaticus*. También, describen que la técnica requiere los componentes básicos que la célula *in vivo* utiliza para replicar el ADN como:

- El ADN de interés a estudiar (llamado ADN molde).
- Dos cebadores (primers), pequeña secuencia de oligonucleótidos sintéticos con un extremo 3´OH libre, a partir de los cuales la *Taq* polimerasa incorporará los nucleótidos durante la síntesis del fragmento de ADN.
- El buffer o tampón que confiere el pH óptimo para la polimerasa, y contiene sales (como cloruro de magnesio) que aportan la fuerza iónica necesaria para potenciar la actividad de la enzima.
- Un extra de cloruro de magnesio, que se ajusta para cada estudio en particular, con el propósito de optimizar la actividad de la polimerasa.
- dNTP´s (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), fuente de nucleótidos con los que se sintetiza el nuevo fragmento de ADN.
- La *Taq* polimerasa que realiza el proceso de amplificación incorporando uno a uno los nucleótidos correspondientes.
- Agua, en la cantidad necesaria para que los componentes queden a una determinada concentración en la mezcla de reacción.

El método de la PCR implica dos cebadores de oligonucleótidos que flanquean el fragmento de ADN a ser amplificado y ciclos repetidos programados en los termocicladores de: desnaturalización de éste por calor, la hibridación de los cebadores a sus secuencias complementarias y su extensión por la ADN polimerasa. Estos cebadores se hibridan a cadenas opuestas de la secuencia diana y están orientados de manera que la síntesis de ADN ocurre en la región entre los cebadores. Puesto que los productos de extensión son también capaces de hibridar con los cebadores, ciclos sucesivos de amplificaciones duplican la cantidad de ADN diana sintetizado en el ciclo anterior. El resultado es una acumulación exponencial del fragmento diana específico, aproximadamente 2^n, donde *n* es el número de ciclos de amplificación realizados (Innis *et al.,* 1990).

Posso & Ghneim (2008) describen con mayor detalle las tres etapas de un ciclo de una PCR:

1. **Desnaturalización** del ADN. El ADN de doble cadena es desnaturalizado mediante el aumento de la temperatura que puede variar entre 92 ºC y 95 ºC.
2. **Apareamiento** (“annealing”). En esta etapa la temperatura es rápidamente reducida entre 35 ºC y 60 ºC, dependiendo esencialmente de la secuencia y tamaño del cebador utilizado, se promueve la hibridación de éste con las secuencias complementarias que flanquean la región “blanco” del ADN molde.
3. **Elongación** o polimerización. La temperatura es elevada a 72 ºC para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir del extremo 3´ de los cebadores mediante la incorporación de nucleótidos, de acuerdo a la secuencia del ADN molde. Para la polimerización se requiere de Mg^{2+}.

La alta especificidad y el rendimiento de la PCR con la ADN polimerasa termoestable (*Taq*) hacen que sea un método ideal para el aislamiento de un fragmento genómico en particular (Innis *et al.,* 1990).

Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR o también llamados amplicones se separan los fragmentos de ADN amplificados, se utiliza la electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida (Scott *et al.,* 1998) y (Tamay, 2013).

Según Agarwal *et al.,* (2008), clasifican a las técnicas básicas de marcadores moleculares de la siguiente manera:

- Técnicas no basadas en PCR o basada en la hibridación.
- Técnicas basadas en la PCR.

Técnicas no basadas en PCR:

RFLP es el Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción. Esta se inicia cortando el ADN con una o más enzimas de restricción. Luego se separan los fragmentos resultantes, según su peso molecular, mediante electroforesis. Posteriormente el polimorfismo de ADN es detectado en el proceso de Southern blot (transferencia del ADN del gel a una membrana de nylon), por hibridación con una sonda de ADN marcada química o radioactivamente. Lo que resulta en un perfil diferencial de fragmentos de ADN. Este perfil se genera debido a sustituciones de nucleótidos o reordenamientos de ADN como inserción o delección o polimorfismos de un único nucleótido. Los marcadores RFLP son: codominantes, heredables, altamente reproducibles y polimórficos. Sin embargo es una técnica muy laboriosa por no ser automatizada.

Técnicas basadas en la PCR:

Después de la invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por Mullis & Fallona (1987), se detallaron un gran número de enfoques para la generación de marcadores moleculares basados en la PCR, principalmente debido a su aparente simplicidad y alta probabilidad de éxito. El uso de cebadores aleatorios superó la limitación de conocimiento previo de las secuencias para el análisis de PCR y facilitó el desarrollo de marcadores genéticos para una variedad de propósitos. Las técnicas basadas en PCR pueden además subdividirse en dos subcategorías (Alcántara, 2007):

1. Técnicas de cebadores arbitrarios basados en la PCR o técnicas de secuencias no específicas.
    a) RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico).
    b) AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).
2. Técnicas de secuencias diana basadas en PCR.
    a) SSRs (Microsatélites o Secuencias simples repetidas).
    b) SNPs (Polimorfismo por un solo nucleótido).

Obtención de las frecuencias génicas:

El primer paso para analizar la estructura y diferenciación genética, es la obtención de las frecuencias alélicas. En genes codominantes en los que se pueden diferenciar los heterocigotos de los homocigotos, como isoenzimas, microsatélites o secuencias de genes nucleares de copia única, es relativamente sencilla la estimación de las frecuencias alélicas y se desprende de los principios básicos de la genética de poblaciones (Eguiarte, 2009).

En el caso de marcadores dominantes, como RAPDs, AFLPs e ISSRs, el problema se complica, ya que los heterocigotos no pueden ser distinguidos de los homocigotos dominantes. A pesar de este problema, dicho marcadores dominantes son actualmente muy populares, ya que permiten analizar directamente grandes secciones neutras del genoma (muchos loci) a un costo muy bajo y en especies para las cuales no hay datos genómicos previos. En estos casos, para calcular sus frecuencias alélicas usualmente se considera que las poblaciones están cerca del equilibrio de Hardy-Weinberg (Eguiarte *et al*., 2010).

3.10.2. Técnica de secuencias no específica: AFLP.

Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) es una técnica de fingerprinting de ADN firmemente establecida con una amplia aplicabilidad en estudios de genética de poblaciones, estudios superficiales de filogenia, mapeo de ligamiento, análisis de parentesco y el desarrollo de marcadores de locus único por PCR (Meudt & Clarke, 2007). Primeramente fue descrita por Vos *et al.,* (1995) a la cual se le han hecho muchos avances técnicos en la generación y el análisis de datos de AFLP.

Esta técnica se ha convertido en una técnica escogida para muchos estudios en plantas, pero recientemente más en animales, hongos y bacterias (Bensch & Åkesson, 2005).

La técnica es generada por una digestión completa del ADN genómico total con endonucleasas de restricción, seguido por dos amplificaciones selectivas por PCR y una subsecuente electroforesis de los fragmentos, resultando de esta manera en un único y reproducible fingerprint para cada individuo (Hoelzel & Green, 1998).

Meudt & Clarke (2007) enumeran los casos en los que la técnica de AFLP puede ser ideal:

- Cuando no existe información previa del ADN de interés.
- Para estudios intra-específicos.
- Cuando la heterogeneidad es alta (por ejemplo, cuando es necesario amplificar muchos loci para determinar una medida precisa de la diversidad genómica, como en especies con fecundación cruzada).
- Cuando la variabilidad genética es baja (por ejemplo, cuando es necesario amplificar muchos loci para localizar cuales son polimórficos; como en especies de cultivo).
- En poliploides.
- Cuando ocurre hibridación.
- Para generar rápidamente datos.

- Cuando hay ADN de alta calidad.
- Cuando no existen marcadores adecuados y establecidos.
- Cuando hay facilidad al acceso de ciertas condiciones (preferiblemente incluyendo instrumento de electroforesis capilar).

Según Paun & Schönswetter (2012), los pasos fundamentales de ésta técnica son básicamente los siguientes:

- Restricción del ADN genómico y ligación de adaptadores para disminuir el número de fragmentos.
- La amplificación preselectiviva por PCR de un subconjunto de los fragmentos restringidos.
- Amplificación selectiva por PCR, para reducir aún más el número de fragmentos.
- Separación de los fragmentos de ADN amplificados por medio de electroforesis.

Restricción-Ligación (RL):

Este paso consta de dos etapas: La restricción, donde el ADN genómico es digerido con un par de endonucleasas de restricción (generalmente con las enzimas *Eco*R I y *Mse* I) produciéndose así, tres tipos de fragmentos de ADN (*Eco-Eco*, *Eco-Mse* y *Mse-Mse*). En el segundo paso, las doble cadenas de *Eco*R I (*Eco*) y *Mse* I (*Mse*) se enlazan complementariamente con los extremos cohesivos y se ligan a los fragmentos de restricción (Meudt & Clarke, 2007).

La amplificación preselectiva:

Se amplifica únicamente a un subconjunto de todos los fragmentos de restricción, para ello se usan cebadores que son complementarios a las secuencias del ADN de interés más un nucleótido adicional (**A, G**, **C** o **T**) en el extremo 3´ del cebador (por lo general *Eco* + **A** y *Mse* + **C**). Estos cebadores "pre-amp" van a unirse a los fragmentos con bases que son complementarias a los nucleótidos selectivos, reduciendo así el número de fragmentos a 1/16 de la cantidad inicial (Vos *et al.,* 1995).

Amplificación selectiva:

El propósito de la amplificación selectiva es la de reducir aún más el número de fragmentos de tal manera que permitan ser visualizados por electroforesis en una segunda ronda de PCR, en la que a los cebadores se adicionan dos bases selectivas y que con el nucleótido del preselectivo totalizan tres (por ejemplo, *Eco* + **ATA** y *Mse* + **CAC**). Uno de los cebadores (ej.: *Eco* + 3) se marca con un colorante fluorescente ("fluorocromo"), de modo que todas las hebras sintetizadas a partir de este cebador se marcarán fluorescentemente. Para

cada individuo, diferentes *Eco* + 3 cebadores selectivos pueden ser etiquetados con diferentes fluorocromo, permitiendo a los productos de diferentes combinaciones de cebadores agruparse para la electroforesis capilar (Ver **fig. 1**.) (Meudt & Clarke, 2007).

Separación y visualización de los fragmentos:

A como lo proponen Paun & Schönswetter (2012), el instrumento (el secuenciador) detecta por capilar fragmentos presentes en el espectro de cada fluorocromo, produciendo así un perfil electrónico de unidades de fluorescencia relativa (RFU) versus el tamaño del fragmento (normalmente 50-500 pb). Los polimorfismos, que se observan como picos presentes en algunas muestras y ausentes en otros, son causados por la ganancia o pérdida de un sitio de restricción. Los perfiles de varios individuos se alinean y se anotan, luego se produce a partir de estos una matriz de datos binarios basada en la presencia (1) o ausencia (0) de un pico.

De acuerdo a estos autores, según el genoma analizado y la abundancia de los sitios de restricción, se deberá incrementar o disminuir el número de nucleótidos para los primers. Para genomas cortos se recomienda usar primers selectivos más cortos, con solo dos nucleótidos. Para genomas más grandes se recomienda usar primers preselectivos más grandes (con dos nucleótidos) como también en la etapa selectiva (cebadores con cuatro nucleótidos). La selección del número de fragmentos logrados con AFLP puede también ser producto de las combinaciones de enzimas de restricción (Paun & Schönswetter, 2012).

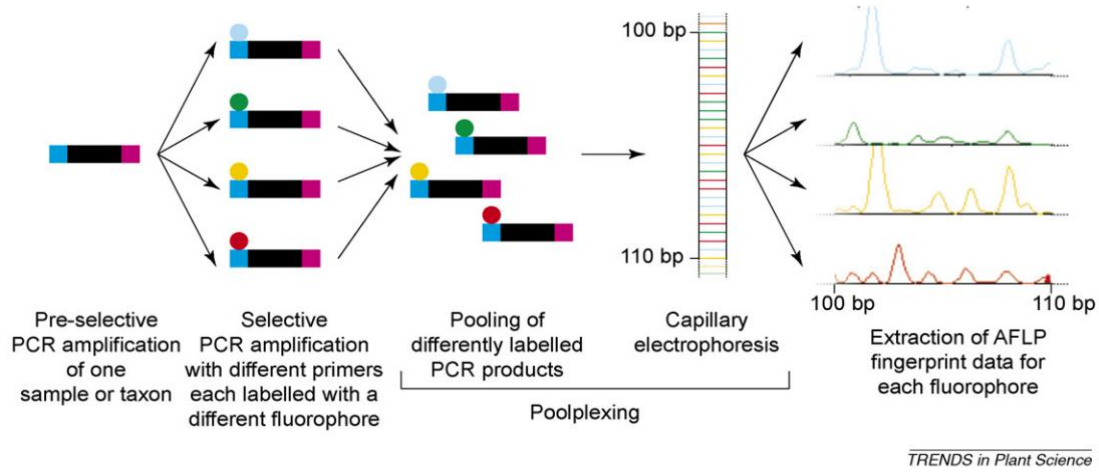


Fig. 1 Metodología para la ténica AFLP, según Meudt & Clarke (2007).

3.10.3. Electroforesis del ADN en geles de agarosa.

Los ácidos nucleicos separados en geles de agarosa pueden visualizarse mediante tinción con colorares fluorescentes, lo cual permite evaluar su integridad y estimar su concentración mediante un análisis comparativo con patrones de concentración conocida (marcador de peso molecular de ADN). Los colorantes fluorescentes se intercalan entre los pares de bases que conforman el ácido nucleico. La tinción usando Midori Green es una alternativa más segura a la tinción tradicional con bromuro de Etidio (Posso & Ghneim, 2008).

3.11. Rango de error en datos de AFLP.

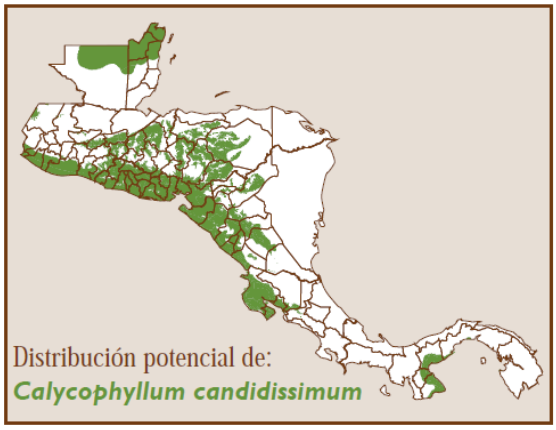
En su revisión Meudt & Clarke (2007) mencionan que la cuantificación de las tasas de error producto de la genotipificación es un componente esencial en un estudio con AFLP. Debido a que por lo general no es posible conocer el "verdadero" genotipo de un individuo, las tasas de error no se pueden evaluar directamente, sino que deben ser estimadas utilizando repeticiones (Pompanon *et al.,* 2005). Mediante el uso de réplicas; la tasa de error por locus se ha estimado entre 2 a 5% para AFLP. Según Mueller & Wolfenbarger (1999) y Bonin *et al.,* (2004) afirman que son pocos los estudios que calculan de forma explícita este dato (Pompanon *et al.,* 2005).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio forma parte de las investigaciones con marcadores moleculares en especies forestales del laboratorio de genética molecular, bajo la línea de investigación del Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnologías de la UNAN-León "Conservación y uso sostenible de los recursos forestales maderables y no maderables" la realización de todos los procedimientos para obtener los marcadores de AFLP, se llevaron a cabo en el Departamento de Organísmica de Paris Lodron Universidad de Salzburgo, Austria; en el período de septiembre 2013 a abril 2014.

Características y descripción del estudio.

Este trabajo es de tipo experimental de corte transversal. Las muestras fueron tomadas en base al mapa "Distribución potencial de: *Calycophyllum candidissimum* en Centroamérica" publicado por Cordero *et al.,* (2003), cubriendo de esta manera más del 80% del área de la distribución de la especie en Nicaragua. Ver **Fig. 2.**



En coloración verde se muestra la distribución potencial de la especie.

Fig. 2. Mapa de la distribución potencial de *Calycophyllum candidissimum* (Vahl.) DC. Según Cordero et al., (2003).

4.1. Selección de poblaciones y método de recolección de muestras.

Se utilizó el mapa antes mencionado para identificar las zonas que potencialmente albergan a la especie; como también la base de datos de las poblaciones muestreadas por el MOBOT. Seguidamente, la selección de los remanentes de bosques que presentaban las mejores condiciones de conservación fueron seleccionados gracias a la colaboración de los

representantes del Ministerio de Ambiente y Recursos Naturales (MARENA) y personal del Herbario “Miguel Ramírez Goyena” HULE; así como también, considerando el vasto conocimiento de los lugareños.

El principal criterio de la selección de las poblaciones, fue el buen estado de conservación del bosque. Las poblaciones finalmente muestreadas fueron: Quilalí, Somoto, Virgen del Hato, El Sauce, A.P. Telica-Rota, A.P. Momotombo, León, Sn. Cayetano (NATURA), Sn. Lorenzo, Sto. Tomás, R.B. Isla de Ometepe, R.V.S. Chacocente-Rio Escalante, El Ostional. Totalizando trece poblaciones. Ver **Fig. 3**.

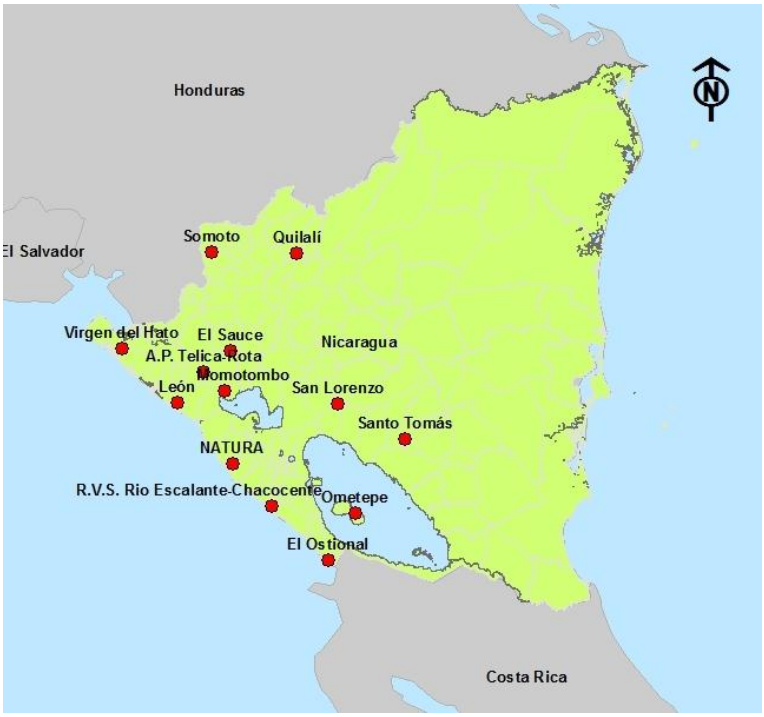


Fig. 3. Mapa de la ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas.

El muestreo se realizó siguiendo la técnica del transecto lineal descrito por González (2006), pero sin establecer a priori la ruta recorrida. Para este estudio se utilizó como patrón del recorrido: caminos, senderos, ríos, arroyos y riachuelos y en otras ocasiones se recorrió atravesando longitudinal y transversalmente los parches del bosque. También se utilizaron las metodologías descritas por Díaz *et al.,* (2001), Cavers *et al.,* (2003), Novick *et al.,* (2003) quienes incluyen los siguientes parámetros:

- Cien metros como distancia mínima entre árboles: Para reducir la probabilidad de elegir individuos cercanamente emparentados.
- Selección de hojas juveniles que faciliten la extracción del ADN, y en buen estado fitosanitario para evitar contaminación de cualquier otro organismo.
- Preservación de las muestras con sílica gel en bolsas plásticas debidamente rotuladas, hasta su completa deshidratación, la cual se logró haciendo cambios periódicos del desecante**.**

- Recolección de un número de 10 a 20 individuos por población.
- Toma de coordenadas geográficas por medio de GPS (GARMIN®).

Además se consideró el DAP, con un mínimo de 23 cm, para garantizar una colecta de árboles maduros y evitar aquellos productos de alguna campaña de reforestación realizada en los últimos 15-20 años.

En la **tabla 2**., se presenta la ubicación de las trece poblaciones, sus altitudes y números de individuos. La población con el menor número de individuos analizados fue Somoto con 10 y el resto con 20. También se agregó el promedio de la máxima y mínima altitud en el que fueron colectadas, oscilando entre los 288 msnm y los 137 msnm. El valor máximo de altitud reportado en este estudio fue de 905 msnm para una muestra ubicado de la población de Somoto y la mínima altitud fue 1 msnm para un individuo de la población de León.

De las trece poblaciones, cinco se encuentran dentro de áreas de conservación; estas son: Momotombo (A.P. Momotombo), Telica-Rota (A.P. Telica-Rota), Sn. Cayetano (Reserva NATURA), Ometepe (R.B. Isla de Ometepe), Chacocente-Escalante (R.V.S. Rio Chacocente-Escalante). Ver **Tabla 4**., y en Anexos **Fig. 20.**

En su mayoría, la condición predominante del bosque fue fragmentado, dato resumido en la **tabla 4**.

Tabla 2. Posiciones geográficas de las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.

Nombre de población	Depart.	Ind.	Coordenadas DMS		Coordenadas UTM		Altitud en msnm		
			X	Y	X	Y	Máx.	Mín.	Media
A.P. Momotombo	León	20	12°27'16.01"	86°33'47.64"	547467,209	1376861,235	187	62	130,1
El Sauce	León	18	12°46'17.82"	86°30'58.73"	552501,797	1411945,206	200	92	131,4
A.P. Telica-Rota	León	17	12°36'19.54"	86°44'14.52"	528525,87	1393532,477	410	63	217,3
León	León	18	12°21'56.28"	86°56'32.99"	506251,388	1367001,604	99	1	46,95
Virgen del Hato	Chinandega	20	12°47'47.36"	87°23'5.26"	458236,67	1414677,793	75	23	45,55
San Lorenzo	Boaco	18	12°21'6.62"	85°39'19.61"	646192,347	1365842,496	321	185	239,3
Quilalí	Nueva Segovia	15	13°32'47.22"	85°59'9.28"	609733,149	1497811,78	536	407	471,9
NATURA	Managua	16	11°52'55.17"	86°30'8.33"	554203,903	1313568,098	164	66	106,2
Somoto	Madríz	**10**	13°33'16.20"	86°40'11.46"	535722,376	1498498,691	905	656	758,4
Santo Tomás	Chontales	16	12° 4'24.91"	85° 7'30.11"	704093,561	1335404,682	432	125	318,2
R.B. Ometepe	Rivas	19	11°29'5.68"	85°31'19.70"	661200,6	1270025,67	267	74	158,8
R.V.S. Rio Escalante-Chacocente	Carazo	17	11°32'52.64"	86°11'11.38"	588708,593	1276708,918	86	6	33,72
El Ostional	Rivas	16	11° 7'20.18"	85°44'27.82"	637490,12	1229804,613	56	25	40,55
Promedio		**17**					**288**	**137**	**208**

Tabla 3. Distancia euclidiana entre pares de poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.

Poblaciones	Chacocente	León	Momotombo	NATURA	Ometepe	Ostional	Quilalí	Sauce	Sn. Lorenzo	Somoto	Sto. Tomás	Telica	Virgen
Chacocente													
León	122,278												
Momotombo	108,311	42,379											
NATURA	50,489	71,795	63,651										
Ometepe	72,799	182,794	156,042	115,517									
Ostional	67,673	189,859	172,423	118,122	46,69								
Quilalí	222,1	166,793	136,037	192,43	233,528	269,441							
Sauce	139,999	64,491	**35,443**	98,392	178,764	200,993	103,192						
Sn. Lorenzo	106,062	139,946	99,338	105,804	96,985	136,316	136,913	**104,419**					
Somoto	228,031	134,759	122,203	185,852	260,662	287,321	74,014	88,165	172,63				
Sto. Tomás	**129,456**	200,349	162,02	151,472	78,193	124,85	187,83	169,819	65,414	234,411			
Telica	131,414	**34,642**	**25,233**	83,986	181,264	196,672	132,17	**30,23**	120,881	105,213	184,94		
Virgen	189,89	67,664	96,913	139,402	249,236	257,507	172,808	94,305	194,196	**114,149**	258,321	73,401	

Matriz de distancia geográfica en Kilómetros entre las trece poblaciones muestreadas.

El valor máximo de distancia geográfica calculado entre los pares de poblaciones vecinas, corresponde a las de Chacocente-St. Tomás con 130 Km; seguido en orden descendente con 114 y 105 correspondiendo Somoto-La Virgen y El Sauce-Sn. Lorenzo respectivamente. El valor mínimo fue de 25 Km entre las poblaciones de Momotombo-Telica; seguido en orden ascendente con 30 y 35 correspondiendo a Sauce-Telica y Telica-León respectivamente. Ver **tabla 3.**

Tabla 4. Caracterización de las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*.

Nombre de población	Área muestreada (Ha)	Individuos	Densidad relativa Ind/Ha	Tipo de bosque	Categoría del área
Momotombo	152.046	20	13	Continuo	**Protegido**
El Sauce	343.657	18	5	Fragmentado	Expuesto
Telica-Rota	294.468	17	6	Fragmentado	**Protegido**
León	130.759	18	14	Fragmentado	Expuesto
Virgen del Hato	117.293	20	17	Fragmentado	Expuesto
San Lorenzo	167.282	18	11	Fragmentado	Expuesto
Quilalí	54.551	15	27	Continuo	Expuesto
NATURA	264.056	16	6	Fragmentado	**Protegido**
Somoto	824.272	10	1	Fragmentado	Expuesto
Santo Tomás	843.977	16	2	Fragmentado	Expuesto
Ometepe	77.723	19	24	Continuo	**Protegido**
Chacocente	36.688	17	46	Continuo	**Protegido**
El Ostional	130.62	16	12	Continuo	Expuesto
Total	3437.392	220	6		

4.2 Generación de datos de laboratorio

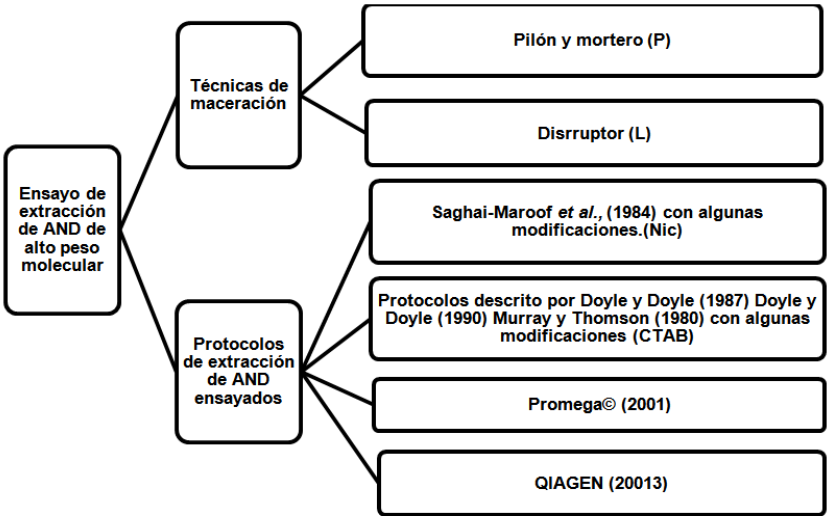
4.2.1. Ensayos para la normalización del ADN y primers a utilizar en AFLPs.

Previo a la extracción de ADN genómico al total de individuos, se procedió a experimentar en un número reducido varios protocolos de extracción de ADN. Igualmente se ensayaron dieciocho combinaciones de primers selectivos.

Selección del protocolo de ADN

La selección del protocolo de extracción de ADN se llevó a cabo para identificar el que mejor se adecuara a las necesidades de la investigación (eficiencia-costo-tiempo). Para ello se tomaron individuos procedentes de diferentes poblaciones considerando que estas no estuviesen concentradas en una misma zona geográfica. Estos fueron procesados en diferentes combinaciones (Ver **Fig. 4**.), de acuerdo a técnica de maceración del tejido [usando pilón y mortero o disrruptor, para este último se usó aproximadamente 1 g de hojas con 2 balines de acero a una frecuencia de 30 seg^{-1} (3 min)] y cuatro protocolos de extracción de ADN genómico (**1.** Promega© (2001); **2.** QUIAGEN (2013); **3.** Una modificación de los protocolos descritos por Doyle & Doyle

(1987 y 1990) y Murray & Thomson (1980) y **4.** El protocolo descrito por Saghai-Maroof *et al.* (1984) con algunas modificaciones. Luego los resultados fueron visualizados por medio de una electroforesis para corroborar la efectividad y calidad de cada procedimiento. Una vez obtenidas las fotografías de la electroforesis y en base a la comparación de intensidad y grosor de las bandas con las del marcador de peso molecular, se procedió a la selección del protocolo de extracción y a la técnica de maceración que se aplicó al total de individuos.



Esquematización de los criterios evaluados para los ensayos de extracción de ADN. En paréntesis se colocan sus códigos con la excepción de los Kit comerciales.

Fig. 4. Parámetros ensayados para la selección del protocolo de extracción de ADN.

En base a criterios de costo-eficiencia del procedimiento, se seleccionó la técnica del disrruptor y el procedimiento de extracción de ADN basado en: Doyle & Doyle (1987 y 1990) y Murray & Thomson (1980) con algunas modificaciones (**CTAB**) y que posteriormente se describirá a detalle.

Extracción de ADN genómico.

Al material pulverizado se añadió 1 ml de tampón 2x CTAB (2% CTAB, 0.1% mercaptoetanol, 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA, 1.4 M NaCl, 1% PVP - 40), rápidamente se incubó por 10 min a 65 ºC en un bloque térmico con agitación. Posteriormente se centrifugó por 5 min (13,000 *g*) e inmediatamente se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorff y se añadió 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó en las mismas condiciones y seguidamente se transfirió la fase superior a un nuevo tubo añadiéndole a su vez 2/3 del volumen de isopropanol frío, mezclando suavemente. Luego se centrifugó por 20 min a máxima velocidad (13,000 g) y con cuidado fue retirado el sobrenadante. El pellet fue lavado en 400 µl de etanol frio al 70%. A continuación , se secó a 50 ^{o}C por 5 minutos en un bloque térmico y se re-suspendió en un volumen apropiado de ddH_2O (20-30 µl); a

esto le siguió una digestión con 0.005 mg de RNase A (FisherScientific, 2014) por 15 minutos a 37 ^{o}C y finalmente el ADN, fue almacenado a -20 ºC.

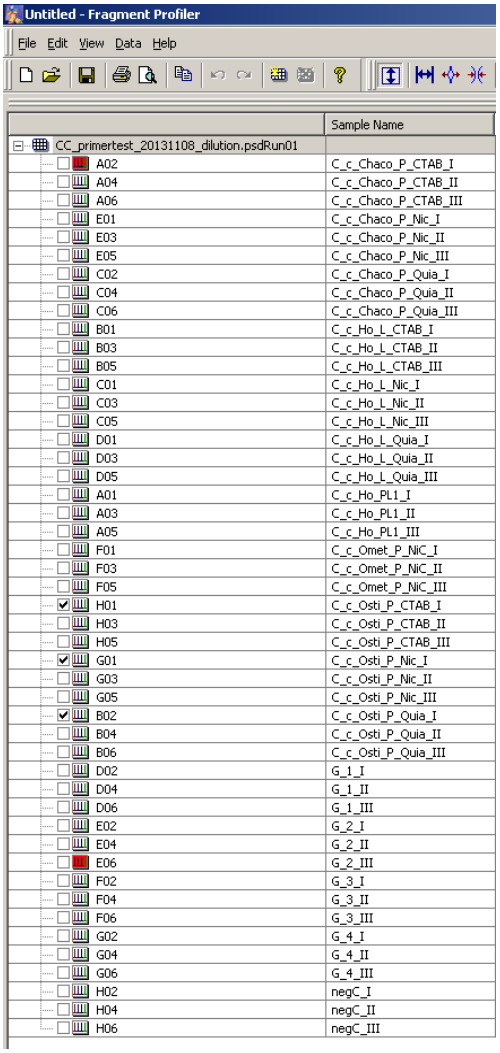
Selección de primers:

De los dieciocho primers ensayados, se seleccionaron tres: *Eco*RI-NED**-AAC** + *Mse*I-**CA,** *Eco*RI-VIC**-AC** + *Mse*I-**CTC** y *Eco*RI-FAM**-AT** + *Mse*I-**CTG**. La elección de éstos fueron tomadas en base al patrón de polimorfismo que brindaba cada combinación con respecto a una misma muestra (control), y en base al patrón de bandas que ofrecían las diferentes combinaciones en muestras de diversas procedencias.

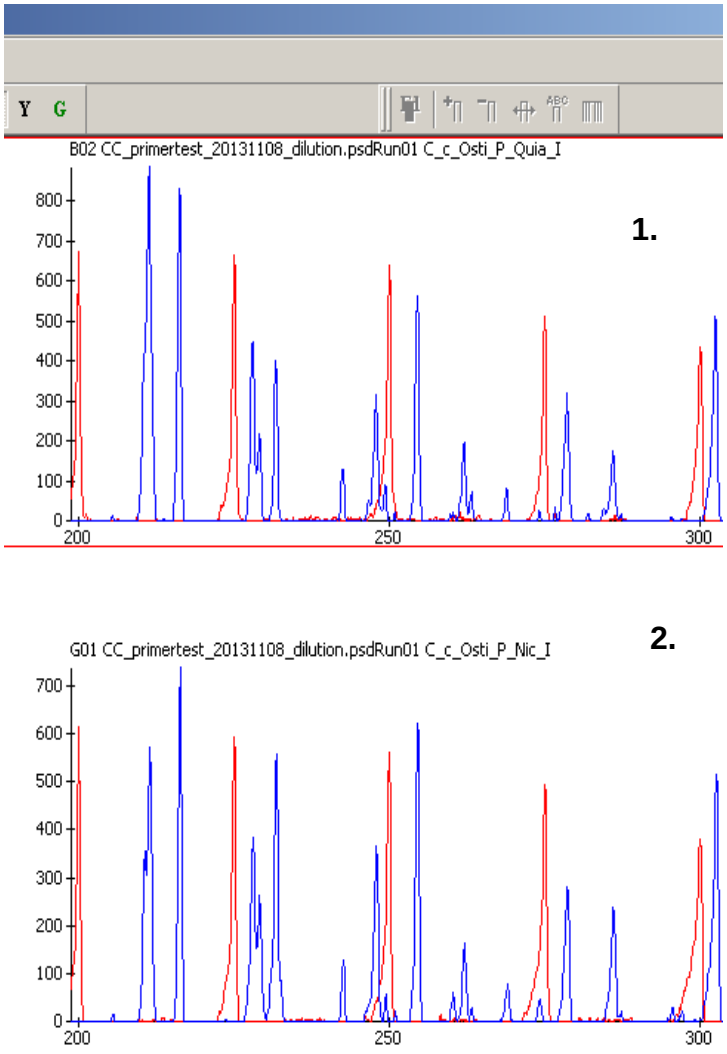
Para generar los datos de la técnica de AFLP estos resultados fueron los que permitieron elegir definitivamente tanto el protocolo de extracción de ADN genómico como los primers selectivos para generar los datos totales.

En la **figura 5. A**, se reflejan las diferentes condiciones de ensayos para la selección del protocolo de extracción de ADN y de los cebadores selectivos. A su vez, en la **figura 5. B**, se observan algunos resultados del electroferograma originados por AFLP en las muestras de *C. candidissimum* ensayadas. Dicha figura refleja el patrón de picos de una misma muestra, procedencia, técnica de maceración y combinación de primers selectivos, con la única excepción de haberse procesado utilizando tres de los cuatro protocolos de extracción de ADN genómico.

A. Parámetros.



B. Resultados obtenidos en las condiciones:



Criterios para la selección de metodología de laboratorio. Especies: Calycophyllum (**C_c**) y Globularia (**G**). Procedencia: Chacocente (**Chaco**), Ometepe (**Omet**), grupo externo (**Ho**) y El Ostional (**Osti**). Métodos de extracción de ADN: **CTAB**, **Nic** y **Quia**. Condición del material vegetal: polvo (**P**), Hoja (**L**).Combinación de primers: **I**, **II** y **III**. Controles negativos (**negC**).

Electroferograma de ensayos para selección de metodología de laboratorio. En las abscisas se ubica en bp la posición del loci y en las ordenadas la intensidad de la señal emitida por el fluorocromo. Especie: *Calycophyllum candidissimum*, población: El Ostional, material: polvo, combinación de Primers: I y protocolo de extracción de ADN:

1. DNeasy Plant Mini Kit –QUIAGEN- (**Quia**).
2. Saghai-Maroof et al., (**Nic**).

Fig. 5. Condiciones de ensayo para la normalización de metodologías de extracción del ADN.

4.2.2. Electroforesis de ADN genómico.

Los resultados de la extracción de ADN fueron comprobados por corridas electroforéticas a 90 voltios por 30 minutos, en geles de agarosa al 1% en buffer TAE al 1X.

Se colocó 5 µl de la muestra de ADN con 3 µl de tampón de carga 6X (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany); también se empleó un marcador de peso molecular Gene Ruler™ 1Kb DNA. El ADN fue teñido con Midori Green (0.8 µL en 50 mL de gel). La visualización de los geles fue realizada en lámparas de UV usando el dispositivo Gel Doc. Para la documentación de los geles se hicieron tomas fotográfícas haciendo uso del paquete informático Quantity One 1-D Analysis (QuantityOne®, 2008).

4.2.3. Generación de marcadores por AFLP.

Las 220 muestras fueron procesadas en grupos de 44, debido a la capacidad de procesamiento del equipo: Sistema de análisis de ADN cromatográfico de The MegaBACE^{TM} (AmershamBiosciences, 2000).

La generación de los marcadores moleculares se obtuvo mediante la técnica de fingerprinting AFLP descrita por Vos *et al*., (1995) y Paun & Schönswetter (2012) con algunas modificaciones. Todos los pasos se llevaron a cabo en hielo. Antes de usar los reactivos se aseguró de disolverlos completamente en el vortex. Una visualización general de los electroferogramas, se observan en la **Fig. 7** y un resumen del procedimiento, en anexos **Fig. 21.**

Para este procedimiento se utilizó aprox. 300 ng de ADN genómico en un volumen de 5.5 µl en ddH_2O.

Restricción y ligación:

Para la restricción (digestión del ADN) y ligación (unión con el adaptador), se utilizaron 5 µl de ADN genómico y 6µl de mezcla, la cual contenía: 0.83 µl de ddH_2O, 1.1 µl 10 x T4 Buffer, 0.5 M NaCl, 1 mg/ml BSA, 50 U/µl de la enzima *Mse*I (Eurofins) y 80 U/µl de *Eco*RI (Promega) además, la mezcla contenía 50 pmol/µl del adaptador *Mse*, 5 pmol/µl del adaptador *Eco* para la ligación y 3U/µl de la enzima T4-Ligase (Promega©, 1996-2007). La incubación se llevó a cabo en el termociclador (AppliedBiosystems©, 2005) a 37 ^{o}C por tres horas y luego a 14 ^{o}C toda la noche.

Una vez finalizada la digestión, se realizó una electroforesis bajo las mismas condiciones antes descritas (electroforesis de ADN genómico) para verificar el producto de la restricción.

La amplificación preselectiva:

La mezcla de la amplificación preselectiva tuvo un volumen final de 10 µl, la cual contenía: 2 µl de la mezcla de restricción y ligación previamente diluida con ddH_2O (1:20), y 8 µl de la mezcla de amplificación selectiva, que contenía lo siguiente: 4.9 µl de ddH_2O, 2 µl del Buffer Green Go *Taq* (Promega©, 2013), 10 mM dNTP (Promega©, 2003-2009), 10 microM *Eco*RI + **A**, 10 microM *Mse*I + **C** y 0.25 µl de una dilución de Go *Taq* (Promega©, 2013), (1:10) con ddH_2O.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador (AppliedBiosystems©, 2005) en un programa diseñado con las siguientes condiciones: Un ciclo de 72 ^oC por dos minutos, 30 ciclos de (94 ^oC por 30 segundos, 56 ^oC por 30 segundos, 72 ^oC por 1 minuto) y un ciclo final a 72 ^oC por diez minutos. Al finalizar la amplificación se dejaron los tubos en el termociclador a 4 ^oC a tiempo indefinido.

Para verificar el producto de la pre amplificación se realizó una electroforesis bajo las mismas condiciones antes descritas (electroforesis de ADN genómico).

Amplificación selectiva:

La amplificación selectiva se llevó a cabo en tres platos, debido a que cada combinación de primer con sus debidos fluorocromos (FAM, VIC y NED) se amplifican por separado. Cada muestra contenía 2 µl del producto de la preselección diluido con ddH_20 (1:20) y 8 µl de la mezcla, la cual poseía lo siguiente: 5 µl de ddH_2O, 2 µl del Buffer Green Go *Taq* (Promega©, 2013), 10 mM dNTP, 10 µM del cebador *Eco*, 10 µM *Mse* (ambos marcados con fluorescencia) y 0,2 µl de una dilución de 1:5 de Go *Taq* (Promega©, 2013) con ddH_2O.

Los cebadores utilizados para ésta amplificación fueron los seleccionados previamente:
*Eco*RI-NED**-AAC** + *Mse*I-**CA.**
*Eco*RI-VIC**-AC** + *Mse*I-**CTC.**
*Eco*RI-FAM**-AT** + *Mse*I-**CTG**.

La PCR selectiva se llevó a cabo en el termociclador siguiendo un programa "Touch Down PCR": con un primer ciclo a 94 ^oC por dos minutos, seguido por

66 ^{o}C por 30 segundos y 72 ^{o}C por dos minutos, 10 ciclos de 94, con decrecimiento de un grado por 30 segundos con una temperatura final de 72 ^{o}C por dos minutos) y un ciclo final a 60 ^{o}C por 30 minutos. Al igual que en las ocasiones anteriores, para verificar el producto de la amplificación selectiva marcados con fluorescencia, se realizó una electroforesis bajo las mismas condiciones antes descritas (electroforesis de ADN genómico) y fueron comparados con una medida estándar interna (AmershamBiosciences, 2000).

Separación y visualización de los fragmentos:

Debido a la capacidad de procesamiento del MegaBACE, las corridas se realizaron simultáneamente en grupos de 48 individuos. La separación de los fragmentos amplificados se llevaron a cabo con el uso de tres tipos de controles: negativo (se utilizó ddH_2O en vez de ADN), positivo (utilizándose los individuos Sauce 6 y 7 obtenidos en los ensayos anteriores) y testigo (elegido al azar de una muestra por plato). Una vez obtenido el total de datos, se realizó una corrida extra en la que se tomaron al azar diferentes muestras con el fin de realizar el cálculo del rango de error.

Se colocó el Sephadex (para filtrar las muestras) en cada agujero del plato Multi Screen (MS) con 300 µl de ddH_2O, se dejó reposar en un mínimo de 3 horas. Luego para recoger el agua y compactar el Sephadex se centrifugó el plato a 600 *g* por 1 minuto. Una vez más se repitieron los pasos anteriores pero en este caso, agregando 150 µl de ddH_2O. Se compactó el Sephadex por centrifugación a 600 g por 5 minutos. El plato MS con el filtro de Sephadex fue colocado en la parte superior de un plato limpio de microtiter para colectar el producto selectivo filtrado.

Luego se procedió a mezclar las reacciones de selección para cada uno de los individuos adicionando; 7 µl del producto NED, 3 µl del VIC y 2 µl del FAM. Luego se procedió a la filtración de las muestras por centrifugación de las muestras en el plato MS a 600 *g* por 5 min.

Dado que el número de muestras en este estudio superaba la capacidad del plato microtiter, se tuvieron que realizar varias corridas; por ello fue necesario preparar un Standard [el cual brinda un perfil producto de una serie de amplicones con tamaños conocidos (con una capacidad de lectura desde 60 hasta 400 nm) para calibrar las diferentes corridas durante la depuración de los datos]. Para la corrida se cargaron 13 µl del MegaBACE ET400-R Size Standard (0.1 µl ROX + 12,9 µl ddH_2O) y 2 µl de la mezcla filtrada. Seguidamente, el plato microtiter fue calentado a 95 ºC por 5 min para desnaturalizar el ADN y fue inmediatamente enfriado utilizando hielo, para luego cargarlas en el secuenciador. La separación de los fragmentos

amplificados se utilizó el equipo sistema de análisis de ADN cromatográfico de The MegaBACE^{TM}. Las cuatro corridas se llevaron a cabo en las siguientes condiciones; Voltios de inyección: 3, Tiempo de inyección: 50, Voltaje en la corrida: 10 y tiempo de la corrida: 100 Minutos usando como estándar a MegaBACE ET400-R Size Standard. Se utilizó 9.8 µl de solución de Hi-Di formamida como tampón de cargar para cada muestra y luego éstas fueron corridas por medio de capilaridad a través de acrilamida (polímero).

Con el software Fragment Profiler (Amersham Biosciences) fueron leídos los datos obtenidos en gráficas (electroferogramas) y para depurar los datos, se utilizó el software DAx, de Mierlo (2006), con el cual también se genera la matriz de presencia-ausencia.

Tipos de Controles

Para la validación de los resultados generados en este estudio, se llevaron a cabo un conjunto de controles, en los que se incluyeron: **Positivos**, **negativos**, **testigos** y **réplicas**. Los positivos fueron dos individuos utilizados en el ensayo de la selección del protocolo de extracción de ADN (Sauce 6 y Sauce 7), los negativos fueron únicamente agua destilada, el testigo fue una muestra seleccionada al azar del conjunto de 44. Las réplicas se generaron al finalizar las corridas de los 220 individuos, los cuales fueron seleccionados también al azar del total de muestras. Este último control fue utilizado para generar el dato del cálculo de rango de error; el cual pretende cuantificar las discrepancias en reproducibilidad de amplificación de los fragmentos obtenidos, mediante comparación de presencia-ausencia de picos en el electroferograma de una misma muestra en corridas diferentes.

Cálculo del rango de error:

Al finalizar la corrida del total de individuos, se procedió a realizar una repetición del procedimiento de AFLP (control final) para corroborar la fidelidad de los resultados. Para este fin, se seleccionaron al azar 16 individuos (7,27%) y se repitieron todos los procedimientos anteriormente descritos (a partir del ADN genómico hasta la PCR selectiva). Una vez depurados los datos y haciendo uso del programa DAx; tanto las réplicas como los resultados totales de los individuos fueron transformados en una matriz: Presencia de pico (1) y en ausencia de éste (0).

El cálculo del rango de error fue generado mediante comparación del resultado de la matriz de presencia-ausencia entre las réplicas y el de sus originales (mismo individuo pero corrido con anterioridad). A continuación se cuantificaron

las discrepancias en reproducibilidad (ausencia o mismatch del amplicón) y el resultado de éste fue dividido entre el total de marcadores analizados de los 16 individuos.

4.3. Análisis de Datos.

Cálculo para la estimación de la estructura poblacional:

Se utilizó un software basado en modelo de agrupamiento para inferir la estructura de las poblaciones, el cual utiliza datos de genotipo. Este modelo asume que hay un número K de poblaciones (donde K puede ser desconocido) y cada uno de las cuales se caracterizan por un conjunto de frecuencias de los alelos en cada locus. A cada individuo se le asigna (probabilísticamente) la pertenencia a una población o conjuntamente a dos o más en dependencia de su genotipo.

El modelo correlacionado de las frecuencias alélicas, utiliza un vector multidimensional que registra las frecuencias de los alelos en una población hipotética “ancestral”.

El tiempo para la ejecución del programa, induce correlaciones entre el estado de la cadena de Markov en diferentes puntos durante la corrida. En la práctica, la longitud de la corrida puede ser determinada por la velocidad del ordenador y el tiempo disponible.

Para determinar las agrupaciones que se forman y las poblaciones que las constituyen, se procedió a partir de la matriz de presencia-ausencia y para la visualización de los cálculos de agrupamiento, se realizó una gráfica tomando los datos resultantes de la probabilidad de pertenencia. Esta esquematización se llevó a cabo en una hoja de Excel, asignando a cada población ancestral un color distinto.

Estimación en términos de diversidad:

Los datos de diversidad génica se realizaron mediante el programa AFLPdat. Para generar estos datos, se partió de la matriz de presencia-ausencia (1-0) creada por el programa DAx y se utilizó el índice de Nei (1987); el cual es una medida de distancias genética entre pares de poblaciones y refleja el número de sustituciones de nucleótido en el ADN. Éste cálculo determina la diferenciación entre poblaciones, especies, etc.

Frecuencia de alelo, diferenciación entre poblaciones y la estimación de AMOVA:

El cálculo estadístico de AMOVA (Análisis Molecular de la Varianza) fue realizado por medio del programa Arlequin ver 3.11 de Excoffier *et al.,* (2007) para estudiar la diversidad genética de las poblaciones. Iniciando a partir de la matriz 1,0 generada por DAx. Los siguientes parámetros fueron los computados: Cálculo estándar de AMOVA (formato haplotipo), cálculo de la AMOVA locus por locus, 1000 número de permutaciones, cálculo de la red de expansión mínima (MSN) entre haplotipos: cálculo de matriz de distancia, cálculo de diferencias por pares (pi) y un nivel de significancia de 0,05.

Prueba de Mantel (aislamiento por distancia):

Con el fin de conocer si una especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir, si existe una correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre pares de poblaciones, se pueden llevar a cabo análisis estadísticos formales como la prueba de Mantel (1967): Cuando en esta prueba existe una correlación positiva significativa entre la distancia geográfica y la genética, existe evidencia de aislamiento por distancia.

Elaboración de mapas:

Para la construcción del mapa se utilizaron los datos geográficos obtenidos por GPS en cada individuo, reflejados en una matriz en Excel. En una columna fueron colocados las coordenadas “X” y en la siguiente las coordenadas “Y” (Ver **tabla 2**.). Para representar una población en el mapa, se tomó un punto medio.

Luego se recurrió a los archivos en formato shapefile: Mapas de Nicaragua y Centroamérica proporcionados por SINIA-MARENA (2000) para la ubicación de las poblaciones, se utilizaron los mapas disponibles por WDPA (2014) y los formatos Gray Earth de NaturalEarth (2014) y con el programa DIVA-GIS 7.5 de Hijmans *et al.,* (2012) se generaron los mapas.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

5.1. Datos de campo.

La presente investigación consistió en determinar la diversidad genética de 220 individuos (árboles maduros), proveniente de 13 poblaciones de *Calycophyllum candidissimum* en Nicaragua mediante AFLP. La identificación de esta especie en el campo fue de fácil labor gracias a las características distintivas del tronco y a la misma arquitectura de la especie.

En la **tabla 2** se puede observar la ubicación de las trece poblaciones muestreadas; como también se incluye el número de individuos y sus altitudes. La máxima altitud encontrada en este estudio fue de 905 msnm ubicada en la población de Somoto y la mínima reportada fue 1 msnm correspondiendo a la población de León. Se observa que este rango coincide con el reportado para la especie según Cordero *et al.,* (2003).

GBIF (2014) reporta la existencia de esta especie a alturas de 1,110 y 1,314 msnm en México y de hasta 1,550 msnm en Costa Rica. Mientras que en países como Venezuela, Costa Rica, Nicaragua y Panamá se registran en esta misma base de datos las altitudes más bajas (a nivel del mar) lo que confirma lo reportado en este estudio.

La mayor distancia geográfica calculada entre pares de poblaciones vecinas corresponde a las poblaciones entre Chacocente-Sto.Tomás con 130 km; seguido en orden descendente con 114 y 106 km correspondiendo a Virgen-Somoto y NATURA-Sn.Lorenzo respectivamente. La menor distancia calculada fue de 25 km entre las poblaciones de Momotombo-Telica; seguido en orden ascendente con 30 y 34 km correspondiendo a Sauce-Telica y León-Telica respectivamente. Ver **tabla 3.**

De los 220 individuos analizados, se generaron 226 marcadores obtenidos por AFLP. Cavers *et al.,* (2005) encuentran una fuerte correlación entre la cantidad de loci analizados y la cantidad de individuos muestreados; la correlación más cercana a uno en *Symphonia globulifera* (nombres comunes: Cerillo, Barillo y Sambo gum), es con un juego de datos que incluyen 200 individuos y 100 marcadores. Estos mismos autores reportan que para el caso de *Eugenia uniflora* (nombres comunes: Capulín, Pitanga o Cereza de Cayena), se utilizaron 278 individuos y 109 marcadores, clasificando estos parámetros como de buen balance (suficientes pero no excesivos). En el caso del presente estudio (226 marcadores y 220 individuos) se puede observar que exceden el

límite de los resultados antes mencionados, aunque no se hizo esta correlación.

La población con menor número de individuos (10) analizados en este estudio corresponde a Somoto. Este dato no es una acepción en este tipo de análisis. Por ejemplo, Cavers *et al*., (2003) al realizar un estudio en *Cedrela odorata* (nombres comunes: Cedro, Acajou o Acayú), utilizaron en dos de sus poblaciones cinco individuos. Russell *et al*., (1999) analizaron en promedio 10 ejemplares por población en *Calycophyllum spruceanum* (nombres comunes: Capirona, Capirona de bajo o Capirona negra). A pesar de estas bajas cantidades de muestras, no significan un impedimento para trabajar en análisis de estructura genético poblacional a como lo sugiere Pons & Petit (1995 & 1996).

5.2. Extracción de ADN genómico y amplificación de AFLP.

El ADN genómico extraído, resultó ser de alto peso molecular a como se aprecia en el gel de la **Fig. 6.,** donde se señala las bandas por encima de los 10,000 pb que corresponden al estándar del marcador de peso molecular.

Además, se aprecia que los resultados son prácticamente los mismos; independientemente de la metodología utilizada, tanto para la maceración del tejido vegetal (pulverización por medio de un disrruptor o por el uso de pilón y mortero), como para la extracción del ADN genómico haciendo uso de diferentes protocolos ensayados, ya que el comportamiento del patrón de picos en el electroferograma es el mismo. Ver fig. **5 B**.

A partir del ADN genómico, se estandarizó la metodología de AFLP para la especie en estudio. En estos ensayos se realizaron pruebas para detectar las combinaciones de primers más productivas (se ensayaron 18 y se seleccionaron tres), con estos ensayos se corroboró la fidelidad de los resultados de la extracción y de la técnica de maceración.

De la lectura de los resultados por AFLP realizados mediante gráficas (electroferogramas), se obtuvo un rango de lectura entre los 50 y los 400 nm. Por lo que para evitar errores de cálculos al contar dímeros de la PCR como también restos de ADN genómico sin haber sido digeridos correctamente, se decidió establecer como parámetros de lectura entre los 80 y los 400 nm.

La combinación del primer con el fluorocromo FAM fue el más productivo porque detectó 89 loci, en segundo lugar los del NED con 88 y por último los del VIC con 49 para totalizar los 226 marcadores.

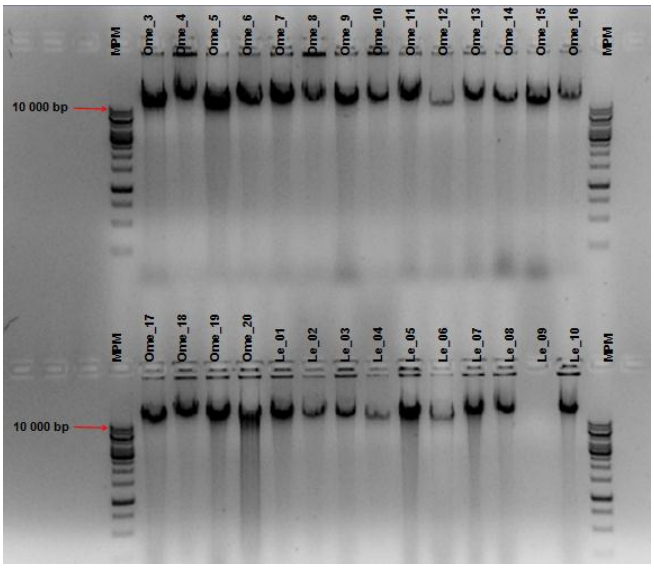


Fig. 6. ADN extraído de *C. candidissimum* (Vahl) DC. Bandas de ADN genómico de alto peso molecular usando el método 2x CTAB en muestras de Ometepe (**Ome**_) y León (**Le**_).

En los gráficos de los electroferogramas, Ver **Fig. 5 B** y **Fig**. **7**., el orden de las abscisas indica la posición del amplicón (locus) representado por un pico según su tamaño y en las ordenadas se indica la intensidad con la que el amplicón reflejó la luminosidad según el marcaje. Los picos con coloración roja reflejan las posiciones del estándar interno (AmershamBiosciences, 2000) utilizado, el cual sirvió como patrón para calibrar las diferentes corridas. Los de coloración azul indican la posición de cada amplicón (locus). En esta misma figura, se observa la exactitud con que las muestras revelan el mismo patrón de picos (azul) independientemente al protocolo de extracción utilizado.

La frecuencia de picos en el electroferograma generados en *C. candidissimum*, se presenta a niveles bajos, posiblemente se deba a dos factores: Especificidad del primer selectivo, como también por el tamaño del genoma de la especie; a como lo menciona Paun & Schönswetter (2012). Ver **Fig. 7.**

Debido a que no existen datos reportados que indiquen el tamaño del genoma para *C. candidissimum*, se podría tomar como información preliminar el generado en este estudio. Puesto que en base al número de loci (picos) analizados, se puede proponer que esta especie posee un genoma pequeño ya que no presentó un alto número de fragmentos amplificados con primers selectivos. Ver **Fig. 7.** Este dato debe ser comprobado utilizando metodologías actualizadas como la secuenciación y compararla con otras especies de la misma familia.

Según Paun & Schönswetter (2012), de acuerdo al tamaño del genoma a analizar se deberá adecuar la escogencia de los primers selectivos (en base al número de nucleótidos). Para este estudio se eligieron primers selectivos con 2 y 3 nucleótidos.

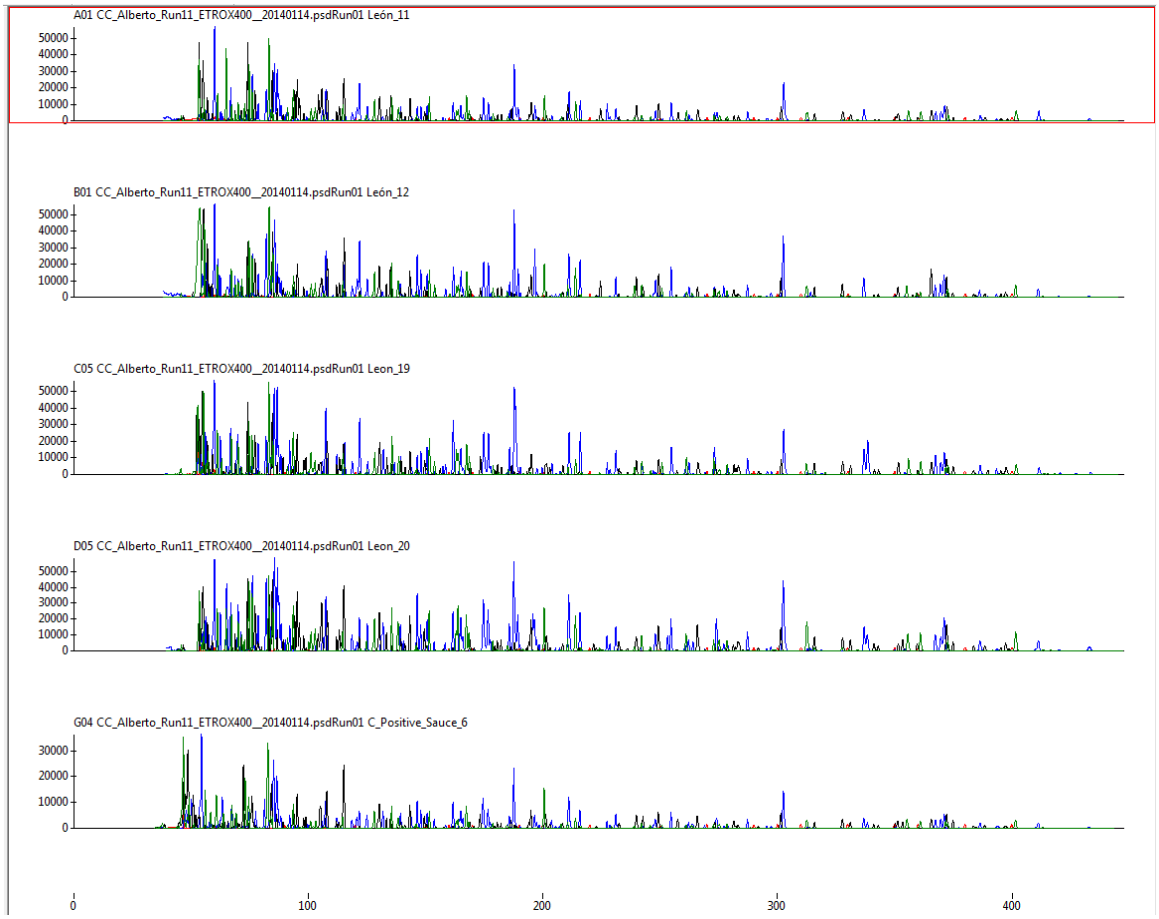


Fig. 7. Resultados de la técnica AFLP en *C. candidissimum*. Electroferograma de las muestras utilizando un estándar interno de 400 bp. Incluye; controles positivos (**C_Posi_Sauce_6** y **C_Posi_Sauce_7**), individuos: (**León**), (**Momotombo**), control negativo (**negative**) y un testigo (**WC_Momotombo_13**).

Lo afirmado anteriormente se refuerza por el hecho de que Leitch *et al.,* (1998) encontraron que en la familia Rubiaceae existe un promedio de 5 pg de ADN. Lo que hace indicar que las rubiáceas albergan especies con genomas pequeños. Además, Stevens (2001) menciona que los genomas de las herbáceas en la familia Rubiaceae parecen ser mayor y la evolución molecular de éstas es más rápida en comparación a la de los miembros leñosas de la misma familia.

5.3. Cálculo del rango de error.

Bonin *et al.,* (2004) y Whitlock *et al.,* (2008) determinaron el umbral óptimo de puntuación para una tasa de error escogida arbitrariamente y considerada como "aceptable", el cual es del 5%. Estos autores indican que el efecto de incrementar el umbral para la selección de locus, repercute tanto en la reducción del rango de error como también en la reducción del número de loci escogidos en el conjunto de datos. El valor calculado para el rango de error (reproducibilidad) para este estudio fue de 1.16 %. Siendo éste, un indicador de

mínima contaminación y por tanto alta reproducibilidad de los resultados. Lo que para Bonin *et al*., (2004) es una prueba de la calidad de los datos. Para este estudio se siguieron parte de las recomendaciones enlistadas por el autor antes mencionado.

Si comparamos el valor de error calculado en este estudio con los reportados por Turner *et al.,* (2013); de 2.4 %, el de Casazza *et al.,* (2013) con 3.12% y el de Marques *et al.,* (2014) con 4.2 %, es claro observar que el nivel de fiabilidad de los datos generados en *C. candidissimum* es muy alto (1.16%).

5.4. Cálculo para estimar la estructura poblacional.

En base a la frecuencia alélica y en dependencia al valor máximo de similitud, los individuos analizados se aglutinaron en 3 grupos (K = 3). Éste fue elegido dado que los individuos pertenecen a una sola especie y una pequeña escala geográfica, el cual muestra una probabilidad de pertenencia aproximadamente -18,000. El grupo con mayor probabilidad de pertenencia que ronda alrededor de los -17,500 y los -18,000 aproximadamente (K=1), sugiere un agrupamiento único de las trece poblaciones. Ese valor no se consideró viable dado que se observa la existencia de poblaciones con comportamientos atípicos como es el caso de El Ostional. Ver **Fig. 8.**

Para una mejor visualización de los resultados de agrupación de las poblaciones muestreadas, se realizó un graficó usando Excel teniendo como dato previo, el cálculo de K obtenido con el programa Structure (Pritchard *et al*., 2010). Como resultado de lo anterior, existen tres agrupaciones evidentes (azul, rojo y negro) que estratifican las trece poblaciones. El primer grupo (color negro) conformado por siete poblaciones: Virgen, Telica, Somoto, Sauce, Quilalí, Momotombo y León; el segundo grupo (color azul) conformado por tres poblaciones: Santo Tomás, Ometepe y Chacocente y el tercer grupo (color rojo) conformado únicamente por El Ostional. Ver **Fig. 9**

Así mismo, se observa que existe un subgrupo compuesto por dos poblaciones (NATURA y Sn. Lorenzo) estos, derivados de la mezcla de dos conjuntos de ancestros (azul y negro); indicando que ambas poblaciones pueden describirse como poblaciones que presentan una alta afinidad tanto al grupo negro como al grupo azul. Ver **Fig. 9.** y en la **Fig. 11.,** la afinidad es para los colores rojo y verde.

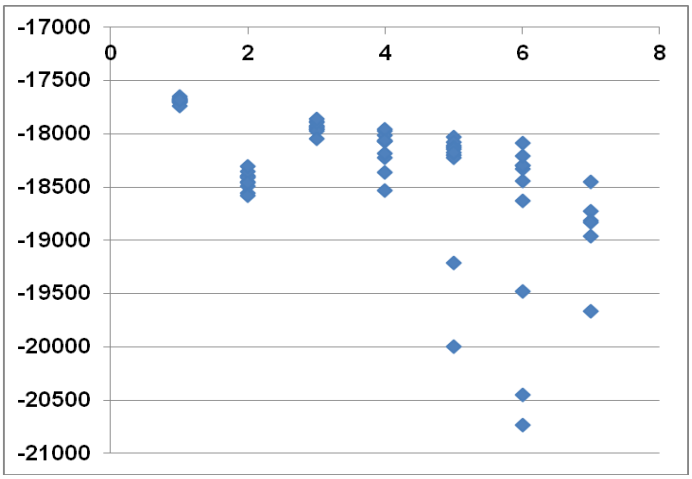


Fig. 8. Gráfica de la probabilidad de agrupamiento de las muestras. En el orden de las abscisas se representan los posibles agrupamientos de las unidades de análisis, que es el valor de K (**0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8**). En las ordenadas se observa el valor de probabilidad de pertenecer a esa agrupación (**-17000 : -21000**).

Dado que el cálculo de rango de error en este estudio fue relativamente bajo, la probable explicación es que estas poblaciones presentan un comportamiento típico de alto flujo genético, mostrando evidencias de una alta interconexión de los bosques en el pasado, al menos hasta hace aprox. 20 años. Hay que recordar que los resultados genéticos poblacionales de este estudio son en cierta manera retrospectivos ya que las unidades de análisis superarían los ~20 años (DAP mayor de 23 pulgadas) y estos reflejan los sucesos estocásticos a los que estuvieron sujetos las poblaciones muestreadas.

De igual modo, es apreciable que ninguna de las trece poblaciones posee un cien por ciento de inferencia de ancestro común (ninguna presenta un único color), esto nos indica que las poblaciones presentan un alto flujo génico con sus vecinas.

Por conveniencia, a partir de ahora se designan los siguientes nombres a los grupos: Norte (conformado por las poblaciones de color negro), Centro-sur (conformado por las poblaciones de color azul) y El Ostional (conformado por la población de color rojo).

En base al grado de focalización (flujo de genes), el primer lugar lo presenta la agrupación de El Ostional, el cual se comporta de una forma única debido al nivel de diversidad y a la conformación de éste grupo por una única población, en segundo lugar la unidad Centro-Sur y en tercer lugar la unidad Norte.

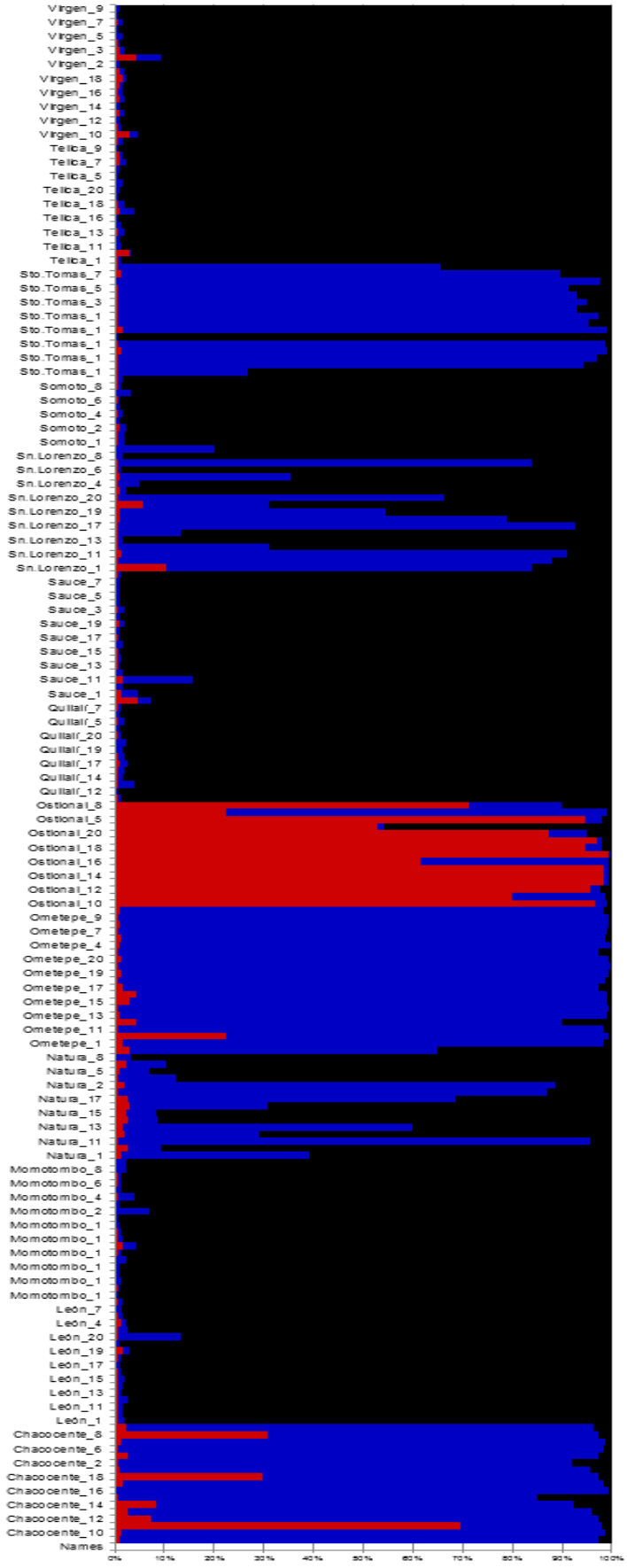


Fig. 9. Análisis Bayesiano. En el orden de las abscisas se ubica el porcentaje inferido de un ancestro por individuo y en las ordenadas se ubican los nombres y procedencia de las muestras. Las coloraciones indican la conformación grupal de las 13 poblaciones.

5.5. Diversidad y Matriz de Distancia genética.

Tabla 5. Análisis de valores de F_{st} entre pares de poblaciones de *C. candidissimum.*

Población	Chacocente	León	Sn. Lorenzo	Momotombo	NATURA	Ometepe	Ostional	Quilalí	Sauce	Somoto	Telica	Sto. Tomás	Virgen
Chacocente													
León	0,07573												
Sn. Lorenzo	0,12538	0,20122											
Momotombo	0,14840	**0,19844**	0,13583										
NATURA	0,04437	0,11757	0,07249	0,15058									
Ometepe	0,05550	0,13668	0,08148	0,11267	0,06363								
Ostional	0,08306	0,11664	0,18545	0,22767	0,11885	0,17026							
Quilalí	0,06198	0,06469	0,16669	0,20052	0,09293	0,13847	0,05039						
Sauce	0,06318	0,07087	**0,18727**	**0,22859**	0,12631	0,15627	0,09582	0,06474					
Somoto	0,04240	0,04118	0,19583	0,20053	0,11709	0,13420	0,10192	0,04575	**0,02958**				
Telica	0,05068	**0,04035**	0,16696	0,18663	0,08047	0,12991	0,07889	0,03917	**0,01341**	0,01788			
Sto. Tomás	0,06068	0,04880	0,18913	0,22370	0,11854	0,14524	0,07805	0,04535	0,01254	0,00520	0,01193		
Virgen	0,01965	0,09834	0,12635	0,18127	0,05721	0,07479	0,07594	0,05615	0,06942	0,06121	0,04135	0,04611	

Matriz de valores F_{st} entre pares de poblaciones.

El valor máximo de F_{st} calculado entre los pares de poblaciones vecinas corresponde a Sauce-Momotombo con 0,22859; seguido en orden descendente con 0,19844 y 0,18727 correspondiendo a León-Momotombo y Sn. Lorenzo-El Sauce respectivamente. El valor mínimo fue de 0,01341 entre las poblaciones de Telica-Sauce; seguido en orden ascendente con 0,02958 y 0,04035 correspondiendo a Sauce-Somoto, León-Telica respectivamente. Ver **tabla 5.**

Tabla 6. Valores de polimorfismo y diversidad génica en las trece poblaciones.

Población	Muestras		H_e
	Colectadas	Analizadas	Media
Momotombo	20	20	0,0965
Sauce	20	18	0,0969
Telica	19	17	0,1001
León	20	18	0,1067
Virgen	20	20	0,1078
Sn. Lorenzo	20	18	0,108
Quilalí	20	15	0,1086
NATURA	20	16	0,1116
Somoto	10	10	0,1128
Sto. Tomás	20	16	0,114
Ometepe	20	19	0,1191
Chacocente	20	17	0,1244
Ostional	20	16	0,1452
Media	19	17	0,1117
D.S.			0,0124
	Total H_e.		0,1238

En el estudio se realizaron pruebas de correlación entre el polimorfismo (diversidad fenotípica), diversidad génica (He), densidad de asentamientos humanos, densidad de individuos analizados y la única informativa y significativa fue la de distancia genética y geográfica (latitudinal).

Se puede observar que las poblaciones con mayor heterocigosidad corresponde a Ostional con 0,14521, seguido de 0.12435, 0,11913, procedentes de Chacocente y Ometepe. Luego las poblaciones que presentan la menor diversidad genética (**H_e**) son Momotombo con 0,09646, 0.0969 y 0.1001 procedentes de El Sauce y Telica respectivamente. Ver **tabla 6.**

Los resultados de ambas tablas se discutirán más ampliamente al momento del análisis de cada grupo y subgrupo poblacional.

5.6. Prueba de Mantel (Aislamiento por distancia).

En este estudio se encontró que en general, las trece poblaciones reflejan un aislamiento por distancia con un coeficiente de correlación de 0,7 y un valor de P (rY1) de 0.000000. con 100 permutaciones. Ver **Fig. 10**.

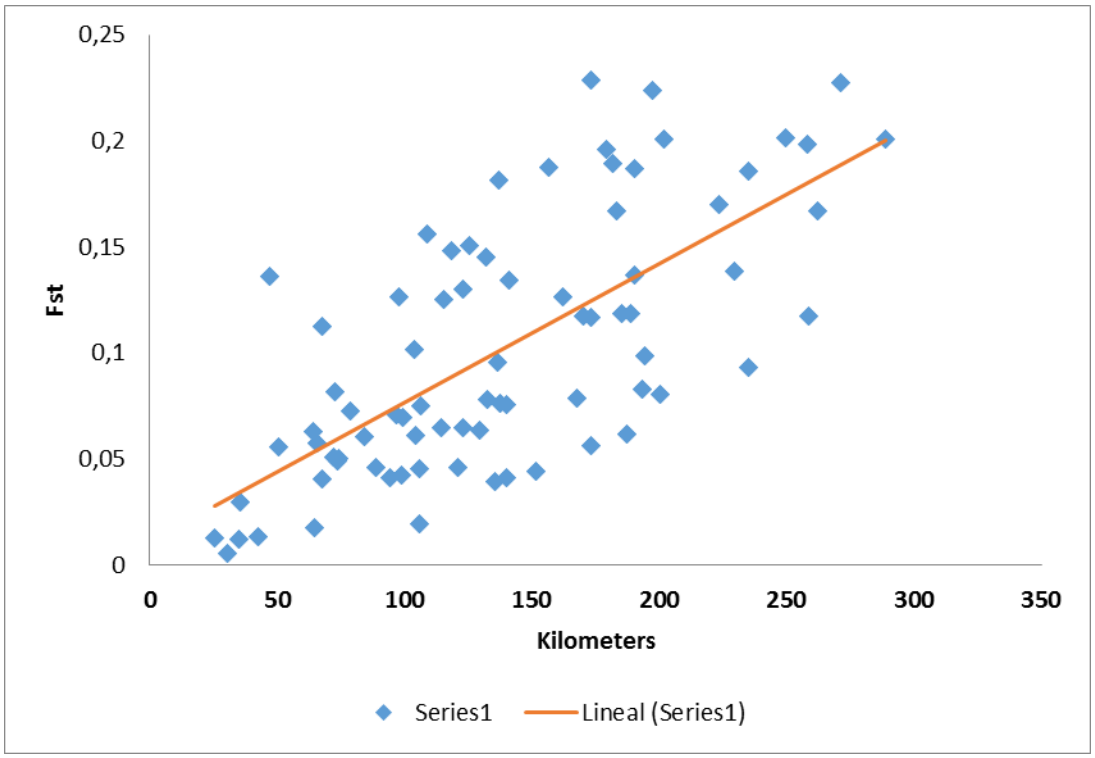


Fig. 10. Prueba de Mantel. Correlación positiva entre el juego de matrices de distancia genética y geográfica. En el orden de las abscisas se ubican las distancias en Km y en las ordenadas los valores de F_{st} de todos los individuos.

Estos datos son igualmente sustentados con los encontrados por Poelchau & Hamrick (2012) quienes descubrieron un comportamiento de aislamiento por distancia, al estudiar mediante la técnica AFLP a tres especies: *Bursera simaruba* (nombres comunes: Jiñocuabo, Palo mulato o Encuero), *Brosimum alicastrum* (nombres comunes: Ramón u Ojoche) y *Ficus insípida* (nombres comunes: Amate, Higuerón, Ojé o Chilamate de río) en Centro América.

Se considera como “aislamiento por distancia” (Wright, 1943) (Ver **Fig. 10.**) cuando una especie presenta una amplia distribución geográfica, generalmente las poblaciones más cercanas son las más parecidas genéticamente, debido a que los individuos tienden a aparearse más con aquellos más cercanos. Lo que implica que al encontrar aislamiento por distancia, el flujo génico es limitado y localizado, lo cual origina que las poblaciones más cercanas en el espacio tengan más flujo génico que las más alejadas (Eguiarte, 2010).

En la revisión hecha por Dick & Heuertz (2008), quienes citan a su vez a Morley (2000) y a Davis *et al.,* (2005) afirman que los bosques tropicales se remontan a la época del Cretácico. Colinvaux *et al.,* (1996) como también Fine & Ree (2006) reafirman que estos se han mantenido estables a través de las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno y en tiempos más tempranos, lo que

proporciona tiempo suficiente para la divergencia a través del proceso de aislamiento por distancia propuesto por Wright (1943).

En un estudio realizado por Novick *et al.,* (2003) encontraron un fuerte patrón de aislamiento por distancia y éste fue consistente con otros estudios a gran escala en árboles tropicales, planteando la posibilidad de que el patrón obtenido se debe más a la geografía de la región que a la distancia *per se* (de por sí misma).

5.7. Divergencia entre poblaciones

Los valores de divergencia genética obtenidos en el AMOVA son de 10,92% entre poblaciones y de 89,08% dentro de poblaciones. Ver **tabla 9**. Estos datos coinciden con los generados en un estudio utilizando AFLP realizado por Russell *et al*., (1999) en la especie *Calycophyllum spruceanum*; en la que encontraron una diferenciación entre poblaciones de 9.4% y entre individuos dentro de poblaciones de 90.6%. También en *Swietenia macrophylla,* Novick *et al.,* (2003) reportaron una moderada diferenciación genética entre poblaciones de 10.9% y dentro de ellas de 89.1%.

Tabla 7. Frecuencia de alelos en las poblaciones (AMOVA).

Regiones	**Todas**	**Norte**	**Centro-Sur**
Fuente de variación	% Variación	% Variación	% Variación
Entre las poblaciones	**10.92**	5.10	7.53
Dentro de las poblaciones	**89.08**	94.90	92.47
Prueba de significancia (1023 permutaciones)			

Análisis AMOVA considerando distintos agrupamientos con un valor de significancia P (rand. value > obs. value) = 0.00000 todas ellas.

En base a los datos obtenidos en el presente estudio, *C. candidissimum* se comporta como una típica especie leñosa; ya que su variación inter poblacional se encuentra dentro del rango de los 10-15% según lo reportado por Hamrick *et al*., (1992). Este autor sugiere que este tipo de especies presentan un amplio flujo de genes entre las poblaciones.

Además, en vista de la ausencia de datos de la biología reproductiva de *C. candidissimum*, se podría decir que esta especie presenta una semejanza a las polinizadas por animales. Por ejemplo, Hamrick *et al*., (1992), midieron la

diferenciación entre poblacional para árboles polinizados por animales con sistema de apareamiento mixto, obteniendo un 10%. De igual modo estos datos coinciden con el de las especies con una amplia distribución a como lo reporta Moran (1992), quien encontró valores que va de 8% a 12% para poblaciones de eucaliptos australianos.

En términos generales, en este estudio es notable el patrón de diversidad genética descendente de Sur a Norte (Ver **fig. 10**); posiblemente éste obedece a una ruta de colonización de la especie desde su origen en Suramérica, hasta México. Esto coincide con lo reportado por Manns *et al*., (2012), quien sugiere que las tribus Ixoroideae y Cinchonoideae se desarrollaron en Suramérica alrededor de 78.5 millones de años, con una sustancial secuencia de dispersión a larga distancia. Tomado de Stevens (2001).

Probablemente la ruta de colonización de *C. candidissimum* en Mesoamérica fue a través del arco del Mioceno temprano, el cual surgió hace aprox. 11-24 Millones de años y luego la migración continuó hacia el arco del Mioceno tardío que a la vez surgió hace aprox. 6 - 12 Millones de años según Hoernle *et al.,* (2008) (ver anexos **Fig. 13** y **14**.); lo que explicaría una posible colonización de la especie en dirección a las nuevas tierras bajas del pacífico y en favor del viento.

Con respecto a su biología reproductiva, *Calycophyllum candidissimum* está reportada como auto-compatible *datos no concluyentes* según Bawa (1974). Lo cual sería un comportamiento atípico en términos de reproducción, ya que las especies del neotrópico son consideradas como autoincompatibles a como lo puntualizan Ward *et al*., (2005).

Basado en lo referido por Vivó, (1964), la influencia de los vientos alisios del noreste en la región de Mesoamérica, fluyen durante todo el año (Nicaragua no es la excepción). Este flujo tiende a crear inestabilidad en las masas de aire ubicadas entre el Caribe y el Pacífico oriental tropical, provocando una diferencia en ambas laderas de las montañas (frente a las cordilleras, barlovento y al lado contrario de la ladera, sotavento) (en anexos ver **Fig**. **22. A** y **B**).

El estudio realizado por Chelton *et al*., (2000), determinó que la barrera formada por la Sierra Madre, en altitudes por debajo de los aproximadamente 750 m de elevación en las montañas de Nicaragua, Costa Rica y Panamá, pueden crear la canalización de los vientos alisios a través de las brechas de los espacios de los golfos de Papagayo (frente a las costas de Rivas) y Panamá y a su vez encontraron que los del golfo de Papagayo, son los de mayores actividades. Todo lo anteriormente mencionado, posiblemente de

explicación al patrón de diferenciación genética encontrado en los grupos poblaciones generados a partir del análisis bayesiano.

Grupo Norte:

En términos de diversidad genética, todas las poblaciones del grupo Norte (Quilalí, Somoto, La Virgen, El Sauce, Telica, León y Momotombo) presentan valores entre 0.10 y 0.11 independiente de su densidad: Quilalí, (27 Ind/Ha) y Somoto (1 Ind/Ha) (ver **tabla 4**). A pesar de que abarcan la mayor área geográfica de los tres grupos, no se encontró un gran contraste en sus niveles de diversidad genética entre las siete poblaciones. Esto se podría explicar por el hecho de que existe flujo génico entre todas las poblaciones, favorecido probablemente por el efecto unificador del viento que circula de Este a Oeste y por individuos aislados que las mantienen conectadas.

Quilalí a como se puede observar en las **figuras 2, 3, 20** y **tabla 6**, es la población ubicada en el extremo más oriental de la zona muestreada, la cual está conectada con el resto de poblaciones del pacífico únicamente por Somoto. Dado que éstas presentan los mismos valores de diferenciación genética que las poblaciones de La Virgen y León (0.11), estos datos sugieren que la población de Somoto está sirviendo como un puente del flujo génico, entre Quilalí y el resto de las poblaciones del Norte de Nicaragua como probablemente con las de Honduras (ubicadas al norte de Somoto).

El menor número de muestras analizadas en este estudio corresponde a la población de Somoto (10 individuos), el cual constituye el doble de las muestras analizadas en dos poblaciones de *Cedrela odorata* reportado por Cavers *et al*., (2003). Actualmente, se tiene en consideración incrementar el número de poblaciones (área geográfica), en oposición a aumentar el número de muestras por población en estudios de estructura genética (Pons & Petit, 1995 & 1996).

Con respecto a la diferenciación genética, entre poblaciones dentro del grupo Norte, el análisis de AMOVA revela un 5.10%, lo que representa la menor estructura y el mayor flujo de genes entre ellas (ver **tabla 7**).

Debido al comportamiento de la relación de distancias geográficas y genéticas; Quilalí, Somoto, La Virgen y El Sauce, manifiestan patrones coincidentes con el de aislamiento por distancia. Lo que implica una relación genética por cercanía debido al flujo génico limitado.

Las posibles causas de las moderadas y homogéneas diversidades genéticas del grupo Norte, sean también producto de factores antropogénicos y las

consecuencias sobre su ecología de apareamiento y dispersión. También desde tiempos de la colonia sus flores han sido empleadas en celebraciones religiosas según lo indican Cordero *et al.*, (2003) y a como es ampliamente conocido, su madera ha sido utilizada para la construcción de postes para cercas y principalmente como un recurso combustible. (Ver en anexos **Fig. 12.**).

Por todo el historial de uso de la tierra en Nicaragua, sabemos que los actuales remanentes de bosques naturales se encuentran altamente perturbados; según la revisión bibliográfica realizada por Griscom & Ashton (2011), *C. candidissimum* es una especie con sucesión secundaria y dispersada por el viento. Este último factor estaría actuando como homogenizador genético. Además hay que recordar que a pesar de la alta fragmentación del hábitat, todavía persisten individuos aislados entre estas poblaciones que sirven de acceso al pool génico y permiten de esta manera la continuidad de su flujo.

Al factor de dispersión, se le suman el de polinización. Para este caso, Nason *et al.,* (1998), argumentan que tanto los insectos polinizadores como el viento juegan un papel fundamental en el sistema de polinización y de esta manera facilitan la movilización de los genes a largas distancias. Lo que se conoce hasta el momento por la literatura revisada es que las abejas productora de miel son potenciales polinizadores de *C. candidissimum,* ya que en el Sur de México, ésta especie está registrada como una planta productora de alta calidad de miel, según Villegas *et al.,* (2003).

Las poblaciones de Momotombo, El Sauce, Telica y León, se analizarán por separado dado que no se ajustan al modelo de aislamiento por distancia encontrado en el resto del total de poblaciones.

Estas poblaciones presentan las menores distancias geográficas [Momotombo-El Sauce (35 km), Momotombo-León (42 Km) y Momotombo-Telica (25 Km)] y a su vez las mayores distancias genéticas [Momotombo-El Sauce (0.23), Momotombo-León (0.20) y Momotombo-Telica (0.19)] (ver **tablas 3** y **5**). Probablemente en el pasado este subgrupo fue una sola población y debido a la actividad antropogénica ésta se fragmentó formando diferentes parches de bosques los que posiblemente por acción de la deriva genética han ido acumulando diferencia genética.

Entre estas poblaciones destaca Momotombo, que es una las más conservadas debido al contexto ecológico y de poca accesibilidad al terreno; ya que la población se encuentra cercana a los accidentes geológicos provocados por el volcán del mismo nombre; además este sector, alberga poca poblacional humana y su la ubicación se sitúa en un área protegida, la cual además, colindante con un área privadas de acceso restringido (Geotérmica de

Momotombo); todo lo anterior favorece a que el bosque esté en el mejor estado de conservación del Grupo Norte.

Además, Momotombo es una de las tres poblaciones que presentaron la menor diversidad genética de las trece analizadas a pesar de ser ésta la más conservada, la posible explicación podría ser su reciente formación dado el historial eruptivo del volcán que lleva su mismo nombre. Ésta población está ubicada en la zona Noroccidental del Volcán y en cercanía de sus lagunas cratéricas. Las muestras se tomaron de individuos que forman parte de una sucesión ecológico producto de los flujos de lava petrificados. Dada su reciente formación, ésta población ha tenido menos tiempo para acumular diversidad genética por mutación y recombinación. Según Morales (2015), la historia eruptiva reportadas con mayor actividad para este volcán datan de 1522 (presentando una marcada actividad), 1609 (llegó a provocar la desaparición de la ciudad capital de León Viejo), 1764, 1886 y la última en 1905.

En el caso de El Sauce y Telica, sus bajos niveles de diversidad genética se podrían explicar por la alta perturbación ecológica de la zona (tales como la tala selectiva, deforestación y destrucción del hábitat alteran la densidad poblacional) afecta igualmente en la estructura demográfica, filogenia y abundancia, diversidad y comportamiento de las comunidades de polinizadores (Dick, 2001, Lowe *et al*., 2005). Esto concuerda con lo propuesto por Slatkin (1987) y Young *et al.,* (1996) quienes aducen que las reducciones en la proporción de genes inmigrantes combinada con la deriva y la pérdida alélica en poblaciones pequeñas, disminuyen la diversidad genética y aumentan la diferenciación entre los remanentes perturbados.

Grupo Centro-Sur:

Éste grupo está conformado por las poblaciones: Chacocente, Ometepe, Santo Tomás, NATURA y San Lorenzo, de éstas, las dos primeras registran un leve aumento (0.12) de variación genética (0.11) con respecto a parte de las poblaciones del grupo Norte y con respecto a la media general y las tres últimas presentan los mismos niveles a la media en general (0.11) (ver **tabla 6**).

Una característica que presenta este grupo es que albergan las poblaciones más conservadas en términos de densidad de individuos por hectárea; exceptuando a Santo Tomás (2/Ha) que es la segunda menos densa del total. Sin embargo, ésta población presenta valores similares de diversidad génica con respecto a sus poblaciones vecinas del Norte. Lo que indica la existencia de flujo génico entre éstas (ver **tabla 4**). Este grupo registra mayor porcentaje de diferenciación entre sus poblaciones (AMOVA) con 7.53% (Ver **Tabla 7**).

Las poblaciones de Chacocente y Ometepe (las más densas dentro de este grupo); son las que reflejan una mayor estructura genética (mayor distancia genética con respecto a sus poblaciones vecinas (NATURA y Sn. Lorenzo).

Este resultado no concuerda con lo reportado por Hamrick *et al.,* (1993); quienes encontraron en poblaciones de alta densidad una débil estructura genética en *Simplex swartzia*. Citado en la compilación realizada por Degen *et al.,* (2001).

A diferencia de Chachocente y Ometepe, las poblaciones de Natura y San Lorenzo conforman una zona de mezcla; puesto que presentan un porcentaje de pertenencia intermedio, ya que comparten frecuencias alélicas tanto del grupo Sur como del grupo Norte (ver **tabla 6** y **Fig. 11**) y que de igual forma se observa en el análisis bayesiano (ver **Fig. 9**). Además, las distancias genéticas entre Sto. Tomás-Sn. Lorenzo (grupo Centro-Sur) y Sn. Lorenzo-El Sauce (grupo Norte) es prácticamente la misma (0.2) a pesar de que la distancia geográfica entre este último par es mucho mayor (105 km), lo que reafirma lo anteriormente expuesto sobre el flujo génico entre éstas (ver **tablas 3** y **5**).

Esta zona de mezcla se comporta de manera similar al resultado obtenido en el estudio biogeográfico realizado por Pringle *et al.,* (2012) en la hormiga *Azteca pittieri,* en el cual utilizaron ADN mitocondrial y encontraron un quiebre genético (Northern and Southern break), el cual coincide con la ubicación de la zona de mezcla formada por NATURA y Sn. Lorenzo. Las zonas de mezclas han sido reportadas en diversos estudios, por ejemplo, Taylor *et al.,* (2014) encontraron una zona híbrida en especies hermanas de aves en Pensilvania. Estos autores afirman que ésta zona se desplaza y sugieren que la causa de esto, probablemente se deba al impacto del cambio climático y sugieren que en las especies leñosas y longevas, el desplazamiento de estas zonas se podría dar de manera más lenta. Por tanto, es de suponer que la zona de mezcla, encontrada en éste estudio, se haya desplazado a medida que *C. candidissimum* ha colonizado Mesoamérica desde Suramérica. Utilizando la técnica AFLP; en la especie *B. alicastrum* en Centroamérica, Poelchau & Hamrick (2012) encontraron zonas de quiebre en la misma área geográfica donde se presenta la zona de mezcla para *C. candidissimum* en este trabajo.

Considerando que sus diversidades genéticas tienen un valor cercano a la media de las trece poblaciones (0.11) y a pesar de que su distancia geográfica es de 106 km (el cual está entre las mayores distancias entre pares de poblaciones vecinas), la distancia genética entre ambas (NATURA-Sn. Lorenzo) es baja; de apenas 0.07, esto nos indica la existencia de un fuerte flujo génico entre ellas y entre los grupos (por ser poblaciones conectoras). Por lo que no se acopla al modelo de aislamiento por distancia y probablemente

debido a la presencia de individuos aislados que las mantienen conectadas (ver t**ablas 3**, **5** y **6**).

Sin embargo; con la influencia de las montañas de Costa Rica y de Nicaragua (las que comienzan a elevarse cerca de las poblaciones de Sn. Lorenzo en dirección Norte), en conjunto estas podrían estar formando un embudo en la zona del lago Cocibolca, lo que reorientaría el viento en dirección de Noreste a Suroeste, ver anexos **Fig. 22 A** y **B.** Suponemos que la intensidad del viento se ve reducido en la zona del grupo centro-sur debido a la altitud de las cordilleras y a la ubicación de dichas poblaciones en la ladera de sotavento; al disminuir la intensidad de éste, no permitiría el desplazamiento de las semillas a largas distancias, produciéndose un efecto homogeneizador, lo que genera una similitud genética entre las poblaciones de este grupo y las del Norte.

Hasta no contar con datos precisos sobre el sistema de apareamiento de *C. candidissimum,* cabría la hipótesis que debido al sistema de dispersión por viento estaría, en cierta medida manteniendo la interconexión del flujo génico.

Ometepe por definición es una isla y se estima que ésta fue separada del continente aproximadamente hace 10.000 años según Gillespie (1994). Haberland (1992) argumenta que según evidencias arqueológicas, la isla fue habitada por sus primeras colonias aborígenes hace 4,000 años.

A pesar de la llegada de los humanos; esta población de *C. candidissimum* presenta una mayor densidad y menores perturbaciones a diferencia del subgrupo de Telica-Momotombo-Sauce que es la zona de mayor intensidad agrícola en el país. La poca perturbación de este bosque, probablemente se deba a que la isla fue principalmente utilizada como centro ceremonial y su población primitiva de aborígenes fue pequeña; sin embargo, hoy en día hay unos 40.000 habitantes (doble de la población de hace tan sólo 30 años). Este aumento ha provocado de que *C. candidissimum*, sea uno de los árboles extraídos con mayor frecuencia (Garber *et al.,* 1999). Este mismo autor reporta que *Alouatta palliate* (nombre común: mono congo) no solo visita, sino que también come hojas, flores y frutos de esta especie.

A pesar de lo reportado por este autor, esta población fue registrada como una de las menos perturbadas, en términos de continuidad del bosque con respecto a las poblaciones en general y dado que la mayor diversidad genética en esta especié se encuentra dentro de las poblaciones, al haber un mayor número de individuos, se obtuvo una mayor diversidad genética. Siendo esta mayor con respecto al grupo Norte. Probablemente el mono congo (*Alouatta palliate)* esté influyendo en la dispersión de semillas de Madroño a lo largo de la isla.

Esperaríamos que Ometepe, como isla, presentara una mayor distancia genética con respecto a las poblaciones vecinas. Sin embargo, la pequeña distancia geográfica entre Ometepe y las poblaciones Chacocente (73 km) y El Ostional (47 km) no parecieran ser suficientes para generar una marcada diferenciación genética. Ver **tablas 3** y **5.** Ya que presentó una menor distancia genética, con respecto a otros pares de poblaciones.

En cuanto a la diversidad genética (ver **tabla 6**), tanto Ometepe como Chacocente, presentan valores similares (0.12) así como a la de Sto. Tomás (0.11). Este resultado parece tener base en el hecho de que existe una barrera permeable que se ubica en el istmo de Rivas como es reportado en otros estudios: Monrrone (2006), Weir *et al.,* (2008), Castoe *et al.,* (2009) y el de Hoffmann & Baker, (2003). Este tema se desarrollará mejor cuando se aborde al grupo Sur (El Ostional).

Lo anteriormente expuesto se explica con la teoría propuesta de la redirección del viento (Noreste-Suroeste) influenciado por la disposición de las montañas de Costa Rica y Nicaragua hacia el lago Cocibolca, y éste actúa como un factor de dispersión de semilla para la especie. Hay que destacar que en el fragmento más angosto del istmo de Rivas se registran las mayores fuerzas de viento en Nicaragua y Centroamérica (National Renewable Energy Laboratory, 2014), como también en Mesoamérica (Chelton *et al*., 2000).

Grupo Sur:

El tercer y último grupo, está formado por la única población de El Ostional, la cual presenta resultados atípicos; al registrar el mayor índice de diversidad génica ($\mathbf{H_e}$ = 0.15) de todas las poblaciones (ver **tabla 6**). Este valor corresponde al límite superior de la diversidad "media" en la escala de Wright (1978). Así mismo; entre los pares de poblaciones de El Ostional-Chacocente y entre El Ostional-Ometepe, se aprecia un claro quiebre al flujo de genes. Esto se refiere a la diferencia en la frecuencia de los alelos en las poblaciones y que se refleja con diferente color en el mapa de la **figura 11**. De igual modo, en el análisis Bayesiano, se observa un pequeño porcentaje de alelos que pertenecen también al grupo Centro-Sur o viceversa (ver **Fig. 9**.).

En un estudio utilizando ADN nuclear, realizado por Pringle *et al.,* (2012) utilizaron ADN nuclear en *Azteca pittieri* (nombre común: hormiga azteca) quien se hospeda en *Cordia alliodora* (nombres comunes: Laurel blanco, Canalete y Ajo ajo), refuerzan esta hipótesis al detectar una zona de quiebre (Northern and Southern break) en el área más meridional de los sitios de muestreo (Sur de Ometepe). A este estudio, se le suman trabajos que muestran comportamientos similares de quiebres en la zona entre Ostional y Ometepe estos son: Monrrone (2006) sobre entomofauna, el de Weir *et al.,* (2008) en

Chlorospingus ophthalmicus (nombres comunes: Tangarita oftálmica, Tangara de monte orejuda o Bush-tanager), el de Castoe *et al.,* (2009) en *Cerrophidion godmani (nombres comunes: Toboa oscura, Borot kabi, Dudaban o Cantil frijolillo)* y el de Hoffmann & Baker, (2003) en *Carollia sowelli* (nombre común: Murciélago de cola corta sedosa). Ver en anexos **Figuras 15** y **16**.

En otro estudio; realizado por Poelchau & Hamrick (2012) se utilizó la técnica AFLP para evaluar la estructura genética de *B. alicastrum*, en un área geográfica que comprende desde El Salvador hasta Panamá; el cual reveló la existencia de una barrera en el istmo de Rivas. De igual modo, Cavers (2003) en *Cedrela odorata* utilizó un análisis de secuencia en el ADN de cloroplastos y explican que posiblemente esta barrera se deba a variaciones de hábitat seco-húmedo y no tanto a factores geográficos. Sin embargo, para estas poblaciones (El Ostional-Chacocente-Ometepe) evidentemente no existe una marcada diferencia de precipitación entre ellas como para generar esta barrera. Además, se desconoce el comportamiento genético de *C. candidissimum* fuera de la frontera de Nicaragua; tampoco hay que descartar el rol potencial de otros dispersores tales como aves, murciélagos y monos, los cuales estarían penetrando la barrera permeable entre El Ostional y el resto de poblaciones.

Los istmos podrían constituir barreras genéticas permeables como en los casos de: Tehuantepec en México [*Amazilia cyanocephala* (nombres comunes: Colibrí corona azul o Azure crowned hummingbird), estudiada por Rodríguez *et al*., (2013)], en Panamá [*Symphonia globulifera (*nombres comunes: Cerillo, Barillo y Sambo gum), estudiada por Dick & Heuertz (2008)] y en Rivas, Nicaragua (casos anteriormente mencionados) (ver en anexos **Figuras 15** y **16**), y se podría suponer que la causa de tales quiebres se deba a los efectos de la orografía en esas poblaciones. La superficie del lago Cocibolca facilita la fluidez e intensidad del viento (ver en anexos **figuras 22 B** y **23**). A mayor intensidad de éste y en dirección de Noreste a Sureste constituiría una limitante en el flujo de los genes de Sur a Norte en *C. candidissimum.* Como esta especie es dispersada por el viento, sería congruente pensar que debido a esta orografía y su efecto sobre el viento, sería la razón de esta barrera.

A modo de resumen, se considerarían las explicaciones de Dick & Heuertz (2008) quienes aducen que la fuerte marca de deriva genética en las poblaciones de Mesoamérica, puede ser en parte por la heterogeneidad topográfica de la región; ésta variación puede ser la consecuencia de la contracción del flujo de genes durante la Última Glaciación Máxima (UMG) Piperno & Jones (2003).

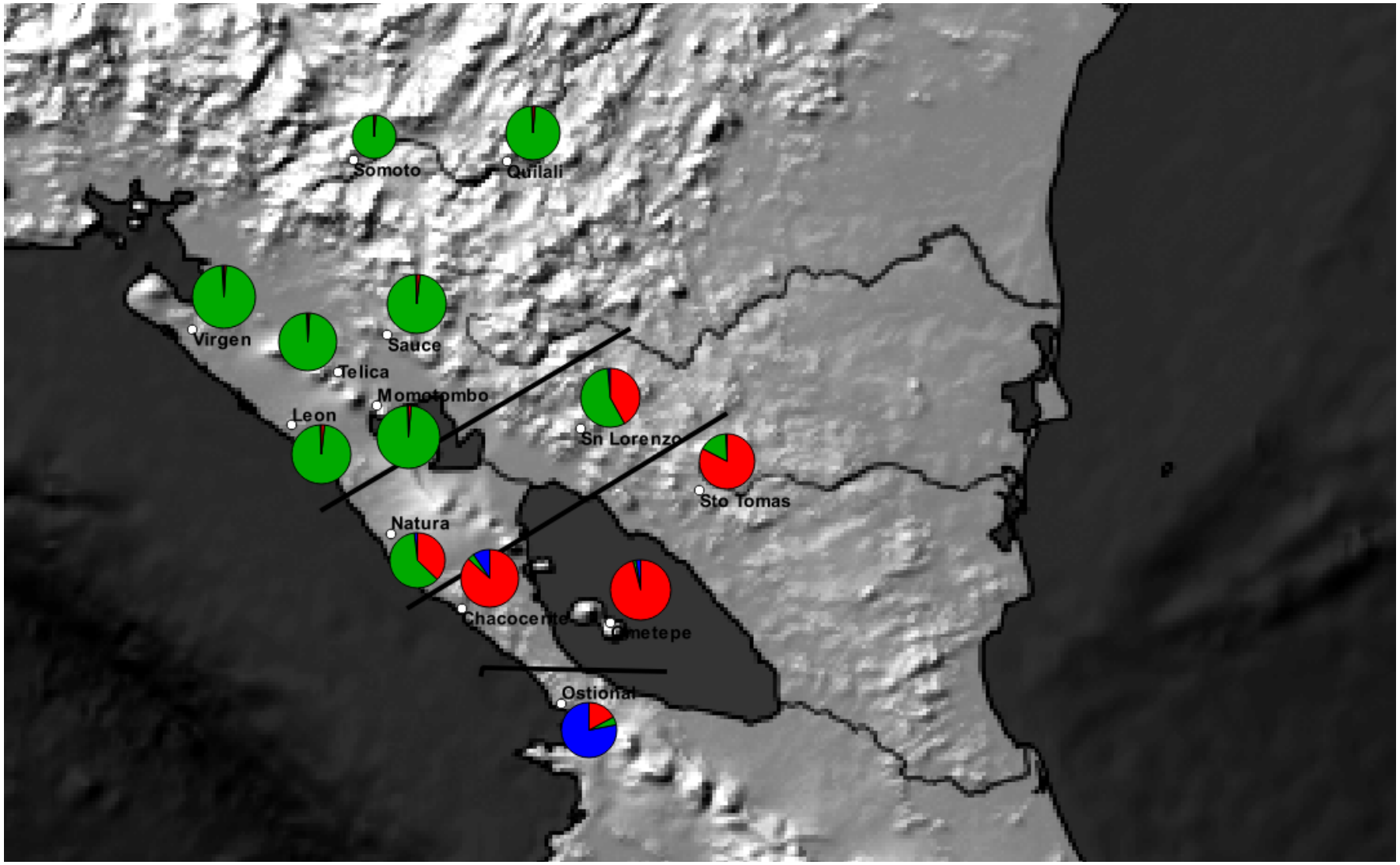


Fig. 11. Esquematizción de la estructura genética-espacial de las poblaciones de *C. candidissimum* muestreadas en Nicaragua.

VI. CONCLUSIONES:

1. Mediante la técnica de AFLP se analizaron 220 individuos y se obtuvieron 226 marcadores. Del análisis Bayesiano se obtuvieron tres agrupaciones: Norte (Quilalí, Somoto, Virgen, El Sauce, Telica, Momotombo y León), Centro-Sur (NATURA, Sn. Lorenzo, Sto. Tomás, Ometepe y Chacocente) y Sur (Ostional).

2. Según los valores de divergencia genética obtenidos en AMOVA, el porcentaje de variación entre poblaciones fue de 10,92% y dentro de estas de 89,08%. Estos datos revelan una baja estructura genética para estas poblaciones.

3. Se detectó un gradiente latitudinal de diversidad genética (aislamiento por distancia); siendo el grupo Sur el que alberga la mayor diversidad y el grupo Norte, el de menor.

4. Los índices de diversidad génica son moderados en las trece poblaciones analizadas (aprox. 0.11). Siendo El Sauce, Telica y Momotombo, las que presentan el menor. Momotombo es la que contiene la mínima diversidad (0.010) y El Ostional la mayor (0.15) que es el límite superior de la diversidad genética “moderada”.

5. En diversidad génica las poblaciones de Sn. Lorenzo, NATURA y Somoto se consideran de transición; las dos primeras entre el grupo Norte y grupo Centro-Sur las que contienen porcentajes de pertenencia de ambos extremos geográficos y en el caso de Somoto, entre Quilalí y el resto de poblaciones del Norte de Nicaragua.

6. En términos de distancias genéticas, los pares de poblaciones que albergan las mayores son: Momotombo-El Sauce, Momotombo-León y Lorenzo-Sto.Tomás con 0.23, 0.19 y 0.19 respectivamente. Las de menor son: Telica-El Sauce, El Sauce-Somoto y León–Telica con 0.013, 0.029 y 0.040 respectivamente.

VI. RECOMENDACIONES:

TRABAJO DE CAMPO:

1. Completar el muestreo de todas las poblaciones de *C. candidissimum* en Nicaragua (San Carlos y Solentiname ambas en el departamento de Rio San Juan), que constituyen aproximadamente el 20% de la distribución geográfica de la especia restante).

GENERACIÓN DE DATOS EN LABORATORIO:

2. Aplicar además la técnica de Microsatélites en ADN de cloroplasto y nuclear, la cual es codominante y por tanto revelaría mayor información de la estructura genética de la especie.

3. Secuenciar ADN de cloroplastos y nuclear con el objetivo de definir tiempos de divergencia poblacional y la historia de colonización de la especie en Nicaragua.

CON PROPÓSITOS DE CONSERVACIÓN:

4. La variabilidad genética encontrada en las poblaciones de: Chacocente, Ometepe y en particular El Ostional, son de importancia para la conservación de la especie. Este recurso genético forestal podría ser utilizado para mitigar la pérdida de diversidad genética encontrado en el grupo Norte a través de planes de reforestación.

5. Los planes de reforestación (conservación *in situ* y *circa situm*), deberían de garantizar además del aumento del tamaño del área, una mayor densidad de esta (en detrimento de la estructura genética) para garantizar la interconexión de los parches de bosques fortaleciendo así el corredor Biológico Mesoamericano.

6. Crear plantaciones forestales (conservación *ex situ*) de esta especie para ser utilizada como combustible y de esta manera disminuir la presión antropogénica sobre las poblaciones naturales. Estas mismas poblaciones podrían ser aprovechadas para la producción melífera en el país.

7. Establecer un banco de ADN *in vitro* para esta especie con el objetivo de contar con material disponible en futuros planes de mejoramiento genético.

BIBLIOGRAFÍA

Agarwal, M., N. Shrivastava, *et al*., (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences." Plant cell reports **27**(4): 617-631.

Alcántara (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. Ecol Mole. 541-566.

Allendorf, F. W., G. H. Luikart, *et al*., (2013). Conser. Genet. Pop. Malaysia., John Wiley & Sons Ltd..

AmershamBiosciences (2000). MegaBACE Genotyping Size Standards. MegaBACE ET400-R Size Standard. The MegaBACE™ DNA Analysis System.

Amos, W. & A. Balmford (2001). When does conservation genetics matter? Heredity **87**(3): 257-265.

AppliedBiosystems© (2005). The GeneAmp® PCR System 9700. App. Biosystems.

Ashton, M.S., Gunatilleke, C.V.S., Singhakumara, B.M.P., Gunatilleke, I.A.U.N (2001). Restoration pathways for rain forests in southwest Sri Lanka: a review of concepts and models. Forest Ecol. Manag. **154**, 1-23.

Azuard, L.E (2007). Guía práctica sobre la técnica de la PCR. Ecol. Molecular. Inst. Nac. Ecol. 517-538.

Bagley, J. & Johnson, J. (2014). Phylogeography and biogeography of the lower Central American Neotropics: diversification between two continents and between two seas. Biol. Rev. **89**(4), 767-790.

Barrett. S. C. & Kohn. J. R (1991). Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. In: Falk DA. Holsinger KE (eds). Genetics and Conservation of rare plants. Oxford Univ. Press. Oxford. pp 3-30.

Baur, B & B. Schmid (1996). Spatial and temporal patterns of genetic diversity within species. Biodiversity: a biology of numbers and difference. Blackwell, Oxford: 169-201.

Bawa, K & J. Beach (1983). Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. Am. J. Botany: 1281-1288.

Bawa, K. S (1974). Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. Evolution **28**: 85-92.

Bawa, K., S. Bullock, *et al*., (1985). Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II: Pollination systems. Am J. Botany **72**(3): 346-356.

Bensch, S. & M. Åkesson (2005). Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? Mol. Ecol. **14**(10): 2899-2914.

Bonin, A., E. Bellemain, *et al*., (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Mol. Ecol. **13**(11): 3261-3273.

Bowen, B. W (1999). Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. Mol. Ecol. **8**: S5-S10.

Cabin, R.J., Weller, S.G., Lorence, D.H., Cordell, S., Hadway, LJ., Montgomery, R., Goo, D., Urakami, A (2002). Effects of light, alien grass, and native species additions on Hawaiian dry forest restoration. Ecological Appl. **12**, 1595-1610.

Cabrero, J & J. Camacho (2002). Fundamentos de genética de poblaciones. EVOLUCIÓN la base de la Biología. M. Soler. Granada, Spain, Proyecto Sur de Ediciones, S.L.**:** 559.

Calvo-Alvarado, A., McLennan, B., Sanchez-Azofeifa, A., Garvin, T (2009). Deforestation and forest restoration in Guanacaste, Costa Rica: putting conservation policies in context. J. Forest Ecol. Manag. **258**, 931-940.

Casazza, G., F. Grassi, *et al*., (2013). Phylogeography of Primula allionii (Primulaceae), a narrow endemic of the Maritime Alps. Botani. J. Linnean Soc. **173**(4): 637-653.

Cascante, A., Quesada. M., Lobo. J. A., Fuchs. E. J (2002). Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. Conserv Biol. **16**: 137-147.

Castoe, T. A., Daza, J. M., Smith, E. N., Sasa, M. M., Kuch, U., Campbell, J. A., Chippindale, P. T., Parkinson, C. L (2009). Comparative phylogeography of pitvipers suggaests a consensus of ancient Middle American highland biogeography. J. Biogeog. **35**, 88-22.

Cavers, S., B. Degen, *et al*., (2005). Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. Heredity **95**(4): 281-289.

Cavers, S., C. Navarro, *et al*., (2003). Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. Mol. Ecol.**12**: 1451-1460.

Ceccon, E., Huante, P., Rincon, E., (2006). Abiotic factors influencing tropical dry forests regeneration. Brazilian Arch. Biol. Tech. **49**, 305-312.

Chan, L. M., J. L. Brown, *et al*., (2011). Integrating statistical genetic and geospatial methods brings new power to phylogeography. Mol. Phyl. Evol. **59**(2): 523-537.

Chelton, Dudley B., Michael H. Freilich, and Steven K. Esbensen (2000). Satellite observations of the wind jets off the Pacific coast of Central America. Part I: Case studies and statistical characteristics. Monthly Weather Review **128**.7: 1993-2018.

Coates, A. G., Colling, L. S., Aubry, M-P., Berggren, W. A (2004). The geology of the Darien, Panama, and the Miocene-Pliocene collision of the Panama arc northwestern South America. Geol. Soc. Am. Bull. **116**(11/12): 1327-1344.

Codron, J. C. G (2011). La biogeografía. Concepto y consideraciones previas. OCW Universidad de Cantabria Web site: http://ocw.unican.es/ciencias-sociales-y-juridicas/biogeografia/materiales/tema-1/1.1-la-biogeografia

Colinvaux, P. A., P. E. de Oliveira, J. E. Moreno, M. C. Miller., M. B. Bush (1996). A long pollen record from lowland Amazonia; forest and cooling in glacial times. Science. **2274**: 85-88.

Conord, C., J. Gurevitch, *et al*., (2012). Large-scale longitudinal gradients of genetic diversity: a meta-analysis across six phyla in the Mediterranean basin. Ecol. Evol. **2**(10): 2600-2614.

Cordero, J., D. Boshier, *et al*., (2003). *Árboles de Centroamérica: un manual para extensionistas.* Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. IICA/CATIE. 179.

Croat, T. B (1978). *Flora of Barro Colorado Island*. Standford University Press, Standford.

Davis, C. C., C. O. Webb, K. J., Wurdack, C. A., Jaramillo., M. J. Donoghue (2005). Explosive radiation of Malpighiales supports a mid-Cretaceous origin of modern tropical rain forests. Am. Nat. **165**: E36-E65.

Declaración del Congreso de Nicaragua (1971). Declárese el Madroño Árbol Nacional de Nicaragua. P. Legislativo. Managua, La Gaceta, diario oficial. **194:** 2440.

Degen, B., Carrion, H., Bandou, E., Maggia, L., Chevallier, M. H., Leveau, A. Kremer, A (2001). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. Heredity. **87**: 497-507.

Dessein, S., H. Ochoterena, *et al*., (2005). Palynological characters and their phylogenetic signal in Rubiaceae. Botanical Review **71**(3): 354-414.

Díaz, V., L. M. Muñiz, *et al*., (2001). Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. Mol. Ecol. **10**(11): 2593-2603.

Dick, C. W (2001). Genetic rescue of remnant tropical trees by an alien pollinator. Proc. Roy. Soc. Lond. B. Sci. **268**: 2391-2396.

Dick, C. W., Abdul-Salim, K., Bermingham, Eldredge (2003). Molecular Systematic Analysis Reveals Cryptic Tertiary diversification of a widespread tropical rain forest tree. Am. Naturalist. The University of Chicago. **162**: 691-703.

Dick, C. W., Etchelecu. G., Austerlitz, F (2003). Pollen dispersal of tropical trees (Dinizia excelsa: Fabaceae) by native insects and African honeybees in pristine and fragmented Amazonian rainforest. Mol Ecol. **12**: 753-764.

Dick, C. W., Heuertz, M (2008). The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. The Society for the Study of Evolution. Evolution. 62-11:2760-2774.

Didham, R.K., Ghazoul. J., Stork. N.E., Davis. A.J (1996). Insects in fragmented forests: a functional approach. Trends Ecol. Evol. **11**:255-261.

Doyle, J. J & J. L. Doyle (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical bulletin **19: 11-15**.

Doyle, J. J. & J. L. Doyle (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus. 1**2**: 13-15.

Eguiarte, L.E (2009). Nueva guía para principiantes a la genética de poblaciones, en Morrone, J.J y P, Magaña (editores). Evolución Biológica. Fac. Cienc. UNAM, DF. México. 83-102.

Eguiarte, L.E., Aguirre-Planter. E., Scheinvar. E., González. G. A., Souza. V (2010). Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimenta, Departamento de Ecología Evolutiva. Inst. Ecol. UNAN, DF. México. fruns@servidor.unam.mx.

Ellstrand, N.C. & Elam, D.R (1993). Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Syst. **24**: 217-242.

Escudero, A., J. M. Iriondo, *et al*., (2003). Spatial analysis of genetic diversity as a tool for plant conservation. Biol. Cons. **113**(3): 351-365.

Excoffier, L., G. Laval, *et al*., (2007). Arlequin 3.11. Computational and Molecular Population Genetics Lab CMPG. An integrated software package for population genetics data analysis. Evolut. Bioinfor. Online, Zoological Institute, University of Berne.

FAO (2012). Taller de Consulta Regional sobre Recursos Genéticos Forestales en América Latina. Documentos de Trabajo: Recursos Genéticos Forestales. FGR. Div. Eval. Ord. Cons. Forestal. FAO, Roma.

FAO (2014). The State of the World´s Forest Genetic Resources. Comm. Genetic Reso. Food and Agriculture.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, Italy**:** 277.

Fine, P.V.A. & Ree, R.H. (2006). Evidence for a time-integrated species-area effect on the latitudinal gradient in tree diversity. Am. Nat. **168**: 796-804.

FisherScientific (2014). Thermo Scientific ™ RNase A, DNase and protease-free. Thermo Fisher Scientific Inc. 2014 **Fisher catalog number: #EN0531**.

Fontdevila, A. & A. Moya (1999). Introducción a la genética de poblaciones. Madrid, Spain, Editorial síntesis, S.A.

Frankham, R., D. A. Briscoe, et al. (2002). Introduction to conservation genetics, Cambridge University Press.

Fuchs, E. J., Lobo, J. A., Quesada, M (2003). Effects of forest fragmentation and flowering phenology on the reproductive success and mating patterns of the tropical dry forest tree *Pachira quinata*. Cons Biol. **17**: 149-157.

Futuyma, D.J (1998). Evolutionary Biology. Third edition. Sinaure Associates, Inc. Suderland Massachusetts. 763

Garber, P. A., Pruetz, J. D., Lavallee, A. C., Lavallee, S. G (1999). A preliminary study of mantled howling monkey (*Alouatta palliata*) ecology and conservation on isla de Ometepe, Nicaragua. Neotro. Primates. **7**(4): 113-117

GARMIN® GPS eTrex VISTA. GARMIN Corporation.

GBIF (2014). The Global Biodiversity Information Facility. Free and Open Access to biodiversity Data. Disponible en: http://www.gbif.org/whatisgbif.

Gentry, A (1982). Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between Central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of Andean orogeny?. Ann. Mo. Bot. Garden. **69**: 557-593.

Gillespie, T.W (1994). A biogeographical and cultural ecological assessment of nature reserves on the Island of Ometepe, Nicaragua. Master´s thesis, California State University, Chico, CA.

Godoy. J. (2009). Genetics, molecular markers and the conservation of species. Ecosistemas **18**(1): 23-33.

González, A. (2006). Ecología: Métodos de muestreo y análisis de poblaciones y comunidades. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

González & Olicares (2012). Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Calycophyllum candidissimum* (Vahl) DC en la rgión del Pacífico de Nicaragua con la técnica RAPD. Dep. Biología. León, Nicaragua., Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León. **Licenciatura en Biología:** 73.

Griscom, H. P & Ashton, M. S (2011). Restoration of dry tropical forest in Central America: A review of pattern and process. Forest Ecol. Manage. doi: 10.1016/j.foreco.2010.08.027

Griscom, H. P., Griscom, B. W., Ashton, P. M (2009). Forest regeneration from pasture in the dry tropics of Panama: effects of cattle, exotic grass, and forested riparia. Rest. Ecol. **17**:117-126.

Haberland, W (1992). The culture history of Ometepe Island: Preliminary sketch (survey and excavations, 1962-1963). In: The Archaeology of Pacific Nicaragua, F. W. Lange, P. W. Sheets, A. Martinez and A. Aberl-Vidor (eds.). University of New Mexico Press, Albuquerque. 63-117

Hamrick, J.L., M. Godt, *et al*., (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. W. T. Adams, S. Strauss, D. Copes and A. R. Griffin (eds.). Pop. Gen. Forest Trees. Springer Netherlands. **42:** 95-124.

Hamrick, J.L., Murawski, D.A., Nason, J.D (1993). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of tropical tree populations. Vegetatio. **107**, 281-297.

Hedrick, P.W (2005). Genetics of populations. Third edition. Jones and Bartlett Pub. Sudbury, Massachusetts. 373

Hedrick, P. W (2011). Jones & Bartlett Publishers. Genet. Populations.

Hengeveld, R (1992). *Dynamic biogeography*. Cambridge University Press.

Hijmans, R., L. Guarino, et al. (2012). DIVA-GIS Software. DIVA-GIS Version 7.5. University of California. U.S. Patent No. 5, 710,835 LizardTech, Inc.

Hoelzel, A. R & A. Green (1998). PCR protocols and population analysis by direct DNA sequencing and PCR-based DNA fingerprinting. Mol. Genetic Anal. Pop. A. R. Hoelzel. Leeds, UK, Oxford University Press. **1:** 445.

Hoernle, K., Abt, D. L., Fischer, K. M., Nichols, H., Hauff, F., Abers, G. A., Strauch, W. (2008). Arc-parallel flow in the mantle wedge beneath Costa Rica and Nicaragua. Nature. **451**(7182), 1094-1097. Disponible en: http://www.geo.mtu.edu/EHaz/ConvergentPlatesClass/carr/Hoernle%20et%20al.%20Nature%202008.pdf

Hoffmann, F. G & Baker, R. J (2003). Comparative phylogeography of short-tailed bats (Carollia: Phyllostomidae). Mol. Ecol. **12**: 3403-3414.

Holderegger, R., D. Buehler, *et al*., (2010). Landscape genetics of plants. Trends Plant Sci. **15**(12): 675-683.

Hooper, E.R., Condit, R., Legendre, P (2002). Responses of 20 native tree species to reforestation strategies for abandoned farmland in Panama. Ecol. Appl. **12**: 1626-1641.

Huertas, M (2004). Curso sobre técnicas en Biotecnología. CNU. UNAN-León, Nicaragua.

Innis, M. A., D. H. Gelfand, *et al*., (1990). PCR protocols: a guide to methods and applications, Acad. Press.

International Biogeography Society (2008). In: http://www.biogeography.org/

Janzen, D. H (1967). Why mointain passes are higher in the tropics. Am. Nat. **101**: 233-249.

Karp, A., S. Kresovich, *et al*., (1997). Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. Rome, Italy, Biodiversity International.

Kiehn, M (1995). Chromosome survey of the Rubiaceae. Ann. Mo. Bot. Garden. 398-408.

Kress, W. J. & J. H. Beach (1994). Flowering plant reproductive systems. La Selva: ecology and natural history of a neotropical rain forest **19**: 33.

Laikre, L., *et al*., (2010). Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on Biological Diversity. Cons. Biology. **24**: 86-88.

Lande. R (1988). Genetics and demography in biological conservation. Science. **241**: 1455-1460.

Lee, C. T., Whickeneswari, R., Mahani, MC., Zakri, AH. (2002). Effects of selective logging on the genetic diversity of *Scaphium macropodum*. Biol Cons. **104**: 107-118.

Leitch, I. J., M. W. Chase, *et al*., (1998). Phylogenetic analysis of DNA C-values provides evidence for a small ancestral genome size in flowering plants. Ann. Botany. **82**(suppl 1): 85-94.

Levin, D.A. 1981. Dispersal versus gene flow in plants. Ann. Mo. Bot. Garden. **68**: 233-253.

Lorence, D. H (1999). A gazetter of Mexican and Central American Rubiaceae. Mono. Syst. Botany Mo. Bot. Gardens. **73**: 1-117.

Losos, J. B & Ricklefs, R. E. (eds.). (2009). The theory of island biogeography revisited. Princeton University Press.

Lowe, A. J., Boshier, D., Ward, M., Bacles, C. F. E., Navarro, C (2005). Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. Review. Nature Publishing Group. Heredity. **95**: 255-273.

Manel, S., M. K. Schwartz, *et al*., (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecol & Evol. **18**(4): 189-197.

Manns, U., Wikström, N., Taylor, C. M., Bremer, B (2012). Historical biogeography of the predominantly neotropical subfamily Cinchonoideae (Rubiaceae): Into or out of America? Internet. J. Plant Sci. **173**: 261-289, In: http://www.mobot.org/MOBOT/research/APWeb/.

Mantel, N (1967). The detection of disease clustering and generalized regression approach. Cancer Res. **27**, 209-220.

MARENA (2000). Dirección General de Biodiversidad y Recursos Naturales, Programa Ambiental Nicaragua-Finlandia. Biodiversity in Nicaragua: A Country Study. 478.

MARENA (2002). Estrategia Nacional de Biodiversidad y su plan de acción. Managua, La Gaceta, diario oficial.

MARENA-DANIDA (1994). *Pinos de Nicaragua.* Centro de Mejoramiento Genético y Banco de semillas Forestales. Managua. Hispamer. 48.

Marques, I., D. Draper, *et al*., (2014). Multiple hybridization events, polyploidy and low postmating isolation entangle the evolution of neotropical species of Epidendrum (Orchidaceae). BMC Evolutionary Biol. **14**(1): 1-14.

Marshall, L. G., Butler, R. F., Drake, R. E., Curtis, G. H., Tedford, R. H (1979). Calibration of the Great American interchange. Science. **204**: 272-279.

Marshall, L. G. Webb, S. D., Sepkosli, J. J. Jr., Raup, D. M (1982). Mammalian evolution and the Great American Interchange. Science. **215**: 1351-1357.

Martin, P. R & J. K. McKay (2004). Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. Evolution. **58**: 938-945.

Meudt, H. M & A. C. Clarke (2007). Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. Trends in plant Science. **12**(3): 106-117.

Mierlo., V (2006). DAx Data Acquisition and Data Analysis, Eindhiven, vers. 8.0. The Netherlands.

Missouri Botanical Garden (2015). *Calycophyllum candidissimum*. Tropicos.org. Disponible en: http://www.tropicos.org/PhenologyCharts.aspx?nameid=27903157&projectid=7

Monrrone, J. (2006). Biogeographic areas and transition zones of Latin America and Caribbean islands based on panbiogegraphic and cladistic analyses of the entomofauna. Ann. Revi. Entomology. **51:** 467-494.

Morales, A. H (2015). Historia volcánica en Nicaragua-Volcán Momotombo. Instituto Nicaragüense de Estudios Territoriales. Dirección General de Geofísica. Dirección de vulcanología. En: http://www.ineter.gob.ni/

Moran, G. F (1992). Patterns of genetic diversity in Australian tree species. New For. **6**: 49-66.

Morley, R. J (2000). Origin and evolution of tropical rain forests. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex.

Mueller, U. G & Wolfenbarger, L. L (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. Trends Ecol. Evol. **14**: 389-394.

Mullis, K. B. & F. A. Faloona (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymology **155**: 335.

Murawski, D. A., Gunatilleke IAUN., Bawa, K. S (1994). The effects of selective logging on inbreeding in *Shorea megisptophilla* (Dipterocarpaceae) from Sri Lanka. Conser. Biol. **8**: 997-1002.

Murray, M. & W. Thomson (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research. **8:** 4321-4325.

Nason, J. D., *et al*., (1998). The breeding structure of a tropical keystone plant resource. Nature. **391**: 685-687.

Nason, D. (2002). La estructura genética de las poblaciones de árboles. *Ecología y conservación de bosques neotropicales.* M. R. Guariguata and G. H.Kattan. Cartago, Costa Rica. Libro Universitario Regional. (EULAC-GTZ)**:** 691.

National Renewable Energy Laboratory (2014). Central America wind energy resource mapping activity. Technical Report. Maintainer by Nicholas Langle. U. S. Dep. of Energy´s. Disponible en: http://en.openei.org/doe-opendata/dataset/80043f89-ef6c-42fd-8366-f4838e046b2c.

NaturalEarth (2014). Gray Earth with Shaded Relief, Hypsography, Ocean Bottom, and Drainages. Natural Earth.

Nei, M (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press. 512.

Nepstad, D., Uhl, C., da Silva, J.M.C (1996). A comparative study of tree establishment in abandoned pasture and mature forest in eastern Amazonia. Oikos **76**: 25-39.

Novick, R., *et al*., (2003). Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. Mol. Ecol. **12**(11): 2885-2893.

Paun, O & P. Schönswetter (2012). Amplified Fragment Length Polymorphism: An Invaluable Fingerprinting Technique for Genomic, Transcriptomic, and Epigenetic Studies. Plant DNA Fingerprinting and Barcoding. N. J. Sucher, J. R. Hennell and M. C. Carles (eds.). Humana Press. **862:** 75-87.

Pérez de la Vega, M (1997). Marcadores moleculares, variabilidad genética y evolución.

Petit, R. J., A. El Mousadik, *et al*., (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. Conserv. Biol. **12**(4): 844-855.

Piñero, D. *et al., (*2008). *Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio. Vol 1.* La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. Capital natural de México. 415-435.

Piperno, D. R (2006). Quaternary environmental history and agricultural impact on vegetation in Central America. Ann. Mo. Bot. Garden. **93**: 274-296.

Piperno, D. R & Jones, J. G (2003). Paleoecological and archaeological implications of a Late Pleistocene/Early Holocene record of vegetation and climate from the Pacific coastal plain of Panama. Q. Res. **59**: 79-87.

PNUD (2003). Segundo Informe sobre Desarrollo Humano en Centro América y Panamá/Proyecto Estado de la Región. San José, Costa Rica**:** 444.

Poelchau, M. F & Hamrick, J. L (2012). Differential effects of landscape-level environmental features on genetic structure in three codistributed tree species in Central America. Mol. Ecol. **21:** 4970-4982.

Pons, O & R. Petit (1996). Measwring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. Genetics **144**(3): 1237-1245.

Pons & Petit (1995). Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. Theoretical Appli. Genet. **90**(3-4): 462-470.

Pompanon, F. *et al*., (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. Nat. Rev. Genet. **6:** 847-859.

Posso & Ghneim (2008). Manual de laboratorio: Uso de marcadores microsatélites para la estimación de diversidad genética en plantas. Caracas, Venezuela. Inst. Venezolano de Inv. Científicas**:** 75.

Pringle, E. G., Ramírez, S. R., Bonebrake, T. C., Gordon, D. M., Dirzo, R (2012). Diversification and phylogeographic structure in widespread Azteca plant-ants from northern Neotropics.Mol. Ecol. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05618.x

Pritchard, J. K., X. Wen, *et al*., (2010). Documentation for *structure* software: Version 2.3. Dep. Statistics, University of Oxford. A model-based clustering method for inferring population structure using genotype data consisting of unlinked markers. Dep. Human Genetics, University of Chicago.

Promega© (1996-2007). T4 DNA Ligase Blue/White Cloning Qualified. Promega Corporation. **Part# 9PIM180**.

Promega© (2001). Wizard® Genomic DNA Purification Kit and the Isolation of Plant Genomic DNA. Promega Corporation. **Cat# A1120**.

Promega© (2003-2009). dNTP Mix. Promega Corporation **Part# 9PIU151** (Catog# U1511).

Promega© (2013). Go*Taq*® G2 DNA Polymerase. Promega Corporation **Part# 9PIM784** (Ref:M7845).

QUIAGEN (2013). DNeasy Plant Mini Kit. QUIAGEN Sample & Assay Technologies **Cat#69104**.

QuantityOne® (2008). Version 4.6.9 Windows and Macintosh. Bio-Rad Laboratories ©.

Ramírez-Arriaga, E., L. A. Navarro-Calvo, *et al*., (2011). Botanical characterisation of Mexican honeys from a subtropical region (Oaxaca) based on pollen analysis. Grana **50**(1): 40-54.

Rieseberg, L.H., y J.M. Burke (2001). The biological reality of species: Gene flow, selection and collective evolution. Taxon **50**: 235-255.

Roa, M. G (2002). *Informe nacional sobre el estado de los recursos genéticos forestales en Nicaragua*.

Rodríguez, G. F., Gutiérrez, R. C., & Ornelas, J. F (2013). Genetic, phenotypic and ecological divergence with gene flow at the Isthmus of Tehuantepec: the case of the azure-crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). J. Biogeography. 40(7), 1360-1373.

Rova, J. H. E., P. G. Delprete, *et al*., (2002). A trnL-F cpDNA sequence study of the Condamineeae-Rondeletieae-Sipaneeae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. Am. J. Botany **89**(1): 145-159.

Russell, J. R., J. C. Weber, *et al*., (1999). Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. Mol. Ecol. **8**(2): 199-204.

Sabogal, C (1992). Regeneration of tropical dry forest in Central America, with examples from Nicaragua. J. Vegetative Sci. **3**: 407-414.

Saghai-Maroof, M. A., Soliman, K. M., Jorgensen, R. A., Allard, R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Nat. Acad. Sci. **81**(24): 8014-8018.

Sánchez-Azofeifa, G.A., Quesada, M., Calvo, J., Rodriguez, J.P., Nassar, J., Garvin, T., Herrera-Peraza, R.A., Schnitzer, S., Stoner, K., Lawrence, D., Gamon, J., Bohleman, S., Van Laake, P., Kalacska, M., (2005). Research priorities for tropical secondary dry forests. Biotropica. **37:** 477-485.

Scott, P., L. Owatha, *et al*., (1998). Mitochondrial DNA isolations, separation, and detection of fragments. Molecular Genetic Analysis of Popoulations. A. R. Hoelzel. Leeds, UK, Oxford University Press. **1:** 445.

Schlötterer, C (2004). The evolution of molecular markers—just a matter of fashion? Nature rev. Genet. **5**: 63.

Sevilla, C., F. Pacheco, *et al*., (2004). An Assessment of the Implementation of International Commitments on Traditional Forest-Related Knowledge in Central and South America.

SINIA-MARENA (2000). Shape file Nicaragua. Sistema Nacional de Información Ambiental (SINIA-MARENA, Nicaragua). Managua, Nicaragua.

Slatkin, M (1985). Gene flow in natural populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. **16**: 393-30.

Slatkin, M (1987). Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science. **236**: 787-792.

Slatkin, M (1994). Gene flow and population structure. Ecol. Genetics. Ed: L. Real. Princeton

Sloan, S (2008). Restoration amidst deforestation: simultaneity and succession. Global Env. Change **18**: 425-441.

Stevens, P. F (2001 hasta la actualidad). Angiosperm Phylogeny Website. Version 12, July 2012. Descargado el: 08/29/2014. Disponible en: http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/welcome.html.

Stevens, W.D., C. Ulloa Ulloa, A. Pool & O.M. Montiel (eds.). (2001). Flora de NicaraguaVol. I.Monogr. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 85.

Taylor, S. A. White, T. A., Hochachka, W. M., Ferretti, V., Curry, Robert, L., Lovette, I (2014). Climate-Mediated movement of an avian hybrid zone. Elsevier. Current Biology. **24**: 671-676.

Tamay de Dios, L., Ibarra, C., y Velasquillo, C (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. En: http://www.medigraphic.com/pdfs/invdis/ir-2013/ir132d.pdf

Turner, B., O. Paun, *et al*., (2013). Analyses of amplified fragment length polymorphisms (AFLP) indicate rapid radiation of Diospyros species (Ebenaceae) endemic to New Caledonia. BMC Evolutionary Biology **13**(1): 269.

Vicente, M. C., Fulton, T., Giraldo, N (2003). Tecnologías de Marcadores Moleculares para estudios de Diversidad Genética de Plantas:. Módulo de Aprendizaje Illus, Nelly Giraldo. Inst. Int. Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia., **1**, 1-52. Disponible en: http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Molecular_Markers_Volume_1_es_04.pdf

Van Bloem, S.J., Lugo, A.E., Murphy, P.G (2006). Structural response of Caribbean dry forest to hurricane winds: a case study from Guanica Forest, Puerto Rico, J. Biogeography **33**: 517-523.

Villegas, G., A. Bolaños, *et al*., (2003). *Flora nectarífera y polinífera en la península de Veracruz. México.* Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Vivó, J (1964). Weather and Climate of Mexico and Central America. Section 6. Handbook of Middle America Indians 1. Robert Wauchope and Robert West. (eds.) ISBN: 978-1-4773-0654-3. University of Texas Press.

Velázques, E., Gómez-Sal, A (2007). Environmental control of early succession on a large landslide in a tropical dry ecosystem (Casita Volcano, Nicaragua). Biotropica. **35**: 601-609.

Vos, P., R. Hogers, *et al*., (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic acids research **23**(21): 4407-4414.

Ward. M., Dick. C. W., Gribel. R., Lowe. A. J (2005). To selfe, or not to self… A review of outcrossing and pollen-mediated gene flow in neotropical trees. Heredity **95**: 246-254.

WDPA (2014). Protected Areas of Nicaragua. Shapefile, ProtectedPlanet.net, UNEP-WCMC, UICN World Comm. Protec. Areas.

Weir, J. T (2008). Implications of genetic differentiations in Neotropical montane forest birds. Ann. Mo. Bot. Garden. **96**: 410-433.

White. G. M., Boshier. D. H., Powell. W (2002). Increased pollen flow counteracts fragmentation in a tropical dry forest: an example from *Swietenia humilis* Zuccarini. Proc Nat Acad Sci USA. **99**: 2038-2042.

Whitlock, M.C. & D.E. McCauley (1999). Indirect measures of gene flow and migration: FST not equal to 1/(4Nm + 1). Heredity **82**:117-25.

Whitlock, R., H. Hipperson, *et al*., (2008). An objective, rapid and reproducible method for scoring AFLP peak-height data that minimizes genotyping error. Mol. Ecol Resources **8**(4): 725-735.

Whitmore, F.C & R. H. Stewart (1965). Miocene mammals and Central American seaways. Science. **148**:180-185.

Woodburne, M. O (2010). The Great American Biotic Interchange: dispersals, tectonics, climate, sea level and holding pens. J. Mammal Evol. **17**:245-264.

Wright, S (1943). Isolation by distance. Genetics. **28**:114-138.

Wrigth, S (1978). Evolution and genetics of population. Vol. 4. Variability within and among populations. Chicago US. University of Chicago Press III.

Young, A., Boyle, T., Brown, A (1996). The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. Trends Ecol Evol. **11**: 413-418.

ANEXOS



Fig. 12. Actividades en la que se utiliza *C. candidissimum* en la cultura popular. Utilización del recurso maderero y no maderero. **a**. Tronco de árbol para la construcción de vivienda. **b.** Combustible. **c.** Postes para cercas. **d.** Ejemplificación de las actividad de extracción de fauna silvestre mediante la quema de troncos (árbol no perteneciente a la especie bajo estudio). **e.** y **f.** Comercialización y decoración para actividades religiosas. **g.** Producto de la quema para la extracción de fauna silvestre **h.** Tipo de fauna silvestre que alverga la arquitectura del árbol.

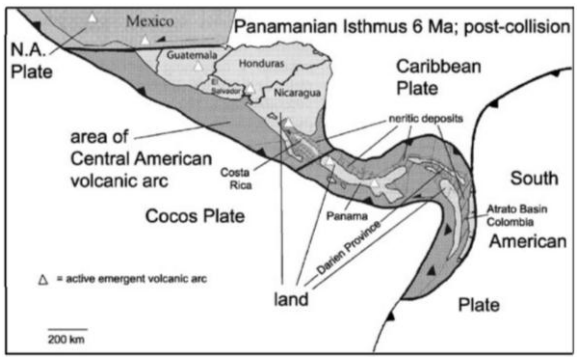


Fig. 13. Reconstrucción del ajuste geológico de la región y el arco volcánico centroamericano hace 6 Ma, según Coates *et al.,* (2004).

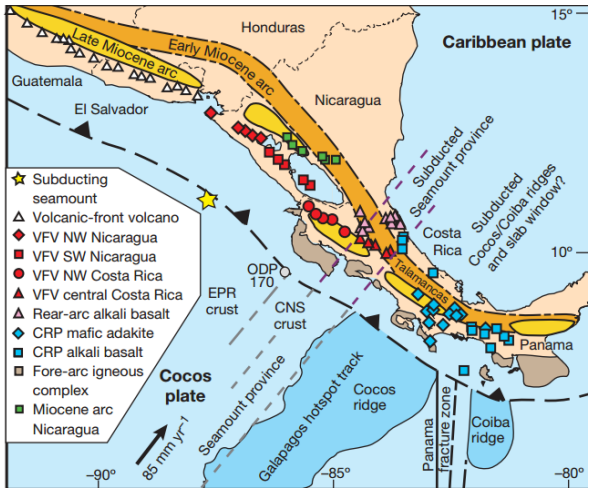


Fig. 14. Proceso formativo geológico de Centroamérica. Según Hoernle *et al.,* (2008).

Actividad reciente del arco volcánico centroamericano (triángulos abiertos). La presencia de numerosas islas, así como la tierra emergente en México, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Colombia, prepararon el escenario para el GABI, antes del cierre definitivo del canal marítimo centroamericano.

Subducción de la provincia montañosa submarina de las Islas Galápagos bajo el centro de Costa Rica y la migración hacia el oeste del arco volcánico que se extiende desde Costa Rica hasta el suroeste de Guatemala. Lapso desde: Mioceno temprano (11-24 hace Ma) al Mioceno tardío (hace 6-12 Ma).

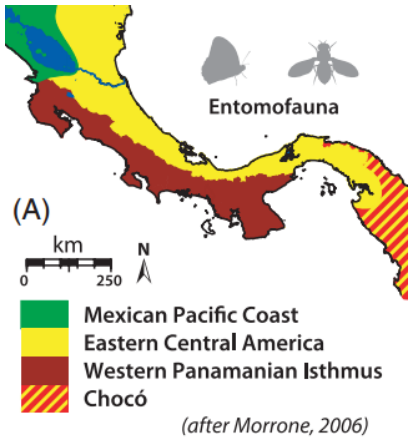


Fig. 15. Ejemplo de límites de las provincias biogeográficas en la parte baja de Centroamérica. Según Bagley y Johnson (2014).

Representación de las zonas de alto cambio de especies para insectos (A). Las Provincias (colores) reflejan áreas de endemismo con asociaciones bióticas distintas. Por debajo de cada panel, se proporciona una leyenda de los nombres de provincia. Los nombres de las provincias se dan a partir de sus fuentes de origen. Morrone (2006).

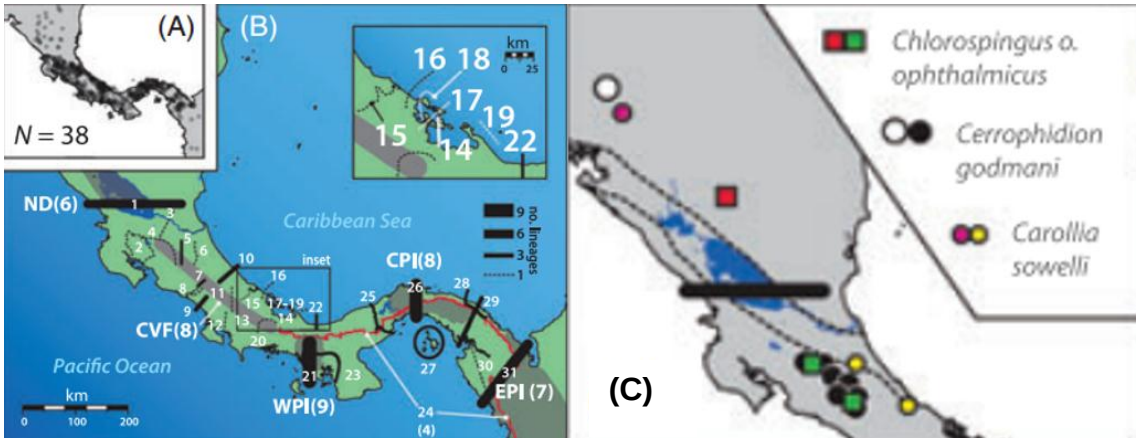


Fig. 16. Esquema de la biodiversidad críptica y estructura filogeográfica en la zona baja de Centroamérica. Según Bagley & Johnson (2014).

A. Mapa resumido de la cobertura geográfica de las poblaciones en revisión. **B**. Mapa de los diferentes quiebres filogeográficos (líneas de diferentes colores) se indica en abreviaturas el nombre de los cinco principales quiebres (los números indican número de taxones): 1: ND = depresión nicaragüense (N = 6). **C**. ND quiebre para el ave *Chlorospingus oftálmico* aves Weir *et al.,* (2008), víbora *Cerrophidion godmani* (Castoe *et al.,* 2009) y los murciélagos *Carollia sowelli* Hoffmann y Baker (2003).

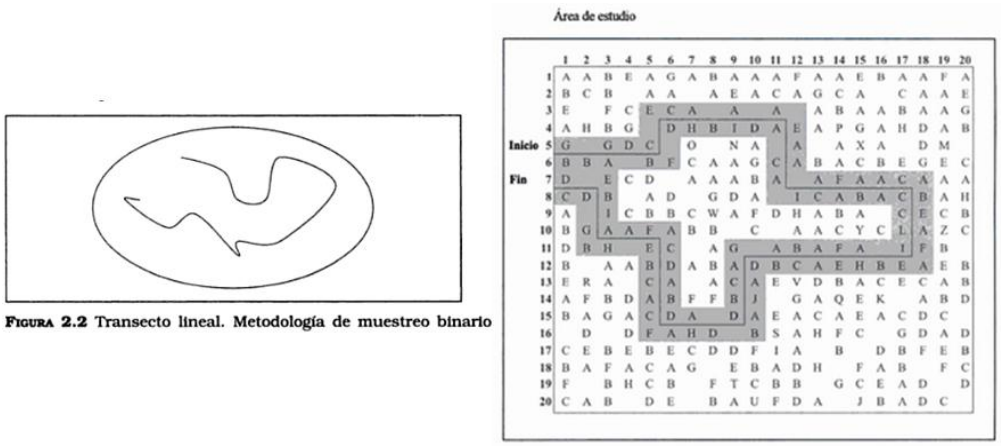


FIGURA 2.2 Transecto lineal. Metodología de muestreo binario

Fig. 17. Metodología del transecto lineal y muestreo binario. Según González (2006).

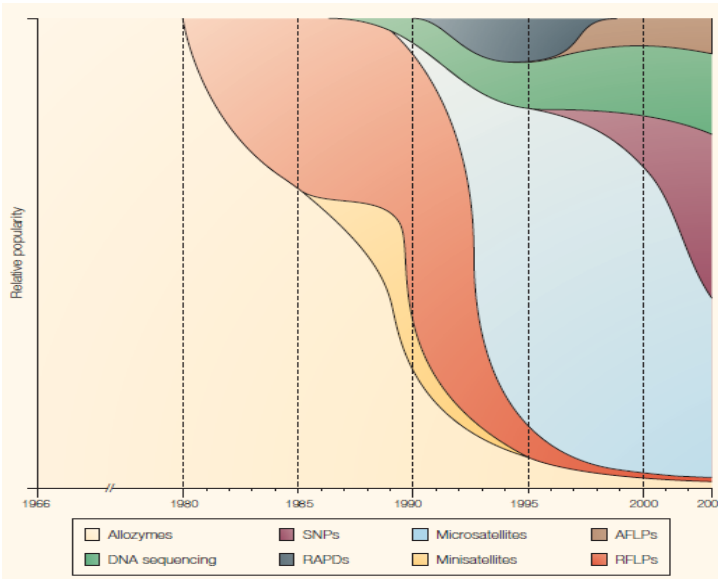


Fig. 18. Visión subjetiva de la importancia relativa del cambio de diferentes marcadores moleculares según Schlötterer (2004). El eje de las abcisas indica el tiempo y las ordenadas corresponden a la utilización de los marcadores moleculares. La importancia del uso del marcador se refleja en la proporción en el eje vertical.
AFLP: polimorfismo de longitud de fragmento amplificado, **RAPD:** Amplificación aleatoria de ADN polimorfismo; **RFLP**, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción; **SNP**, el polimorfismo de un solo nucleótido.

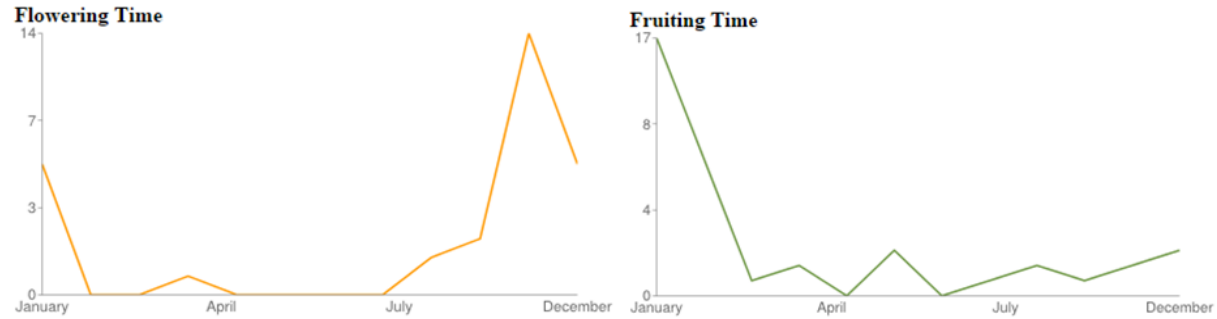


Fig. 19. Gráficos de la fenología de *C. candidissimum* (Vahl.) DC. Según Missouri Botanical Garden (2015). Fluctuaciones de eventos de floración y fructificación de la especie durante el año.

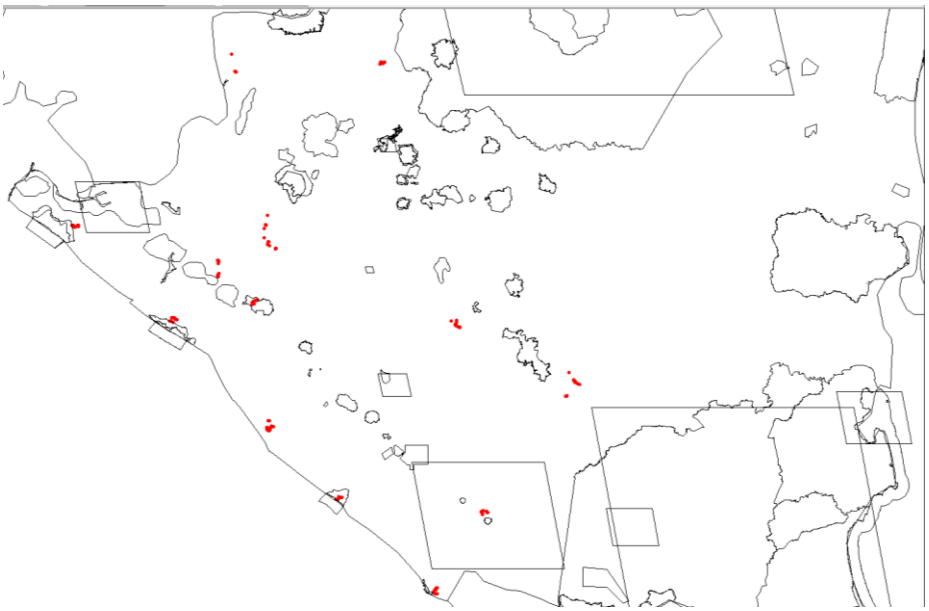


Fig. 20 Localización de los individuos muestreados de *C. candidissimum* (Vahl.) DC y áreas de conservación de Nicaragua. Mapa de la ubicación de los individuos muestreados y ubicación de áreas protegidas Nicaragua. Puntos rojos indican la posición de cada individuo. Rectángulos y polígonos indican las áreas protegidas declaradas. Con la ecepción del área protegida NATURA, la cual no está reflejada en polígono.

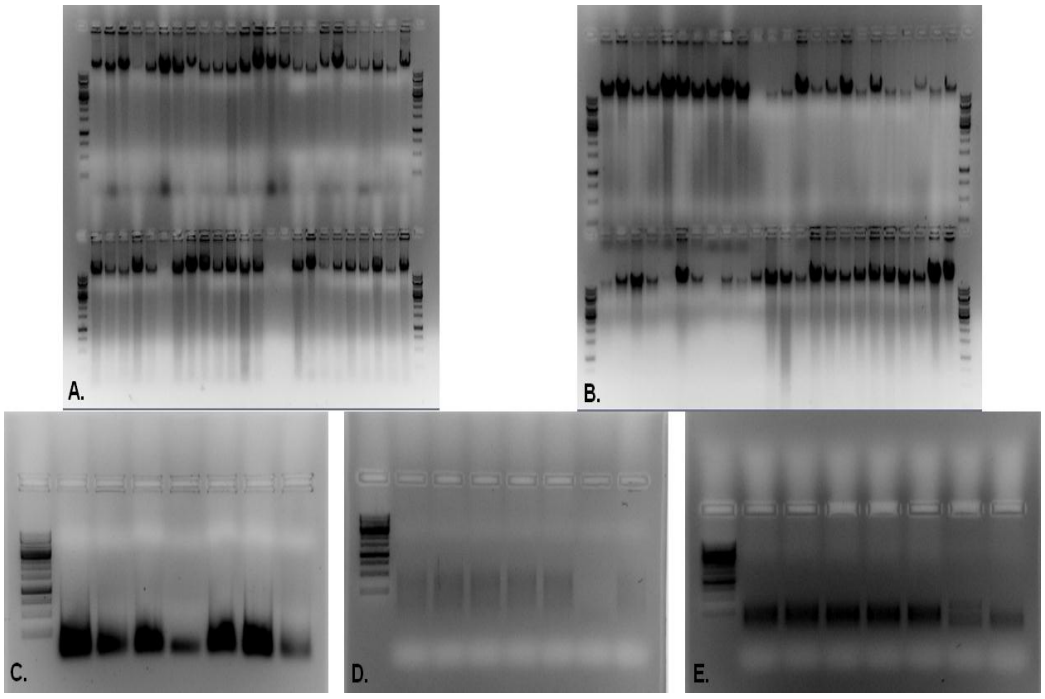
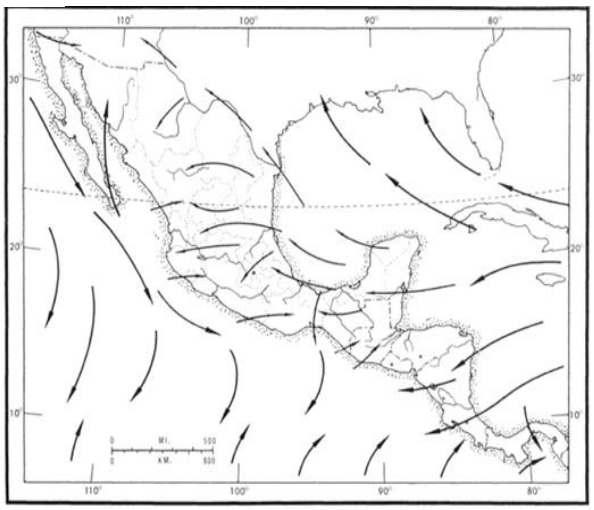


Fig. 21 Procedimiento de generación de datos de AFLP para este estudio. Electroforesis de geles de agarosa. **A.** y **B.** Extracción de ADN genómico de alto peso molecular de diferentes poblaciones. **C.** Restricción del ADN genómico y Ligación de adaptadores. **D.** Amplificación preselectiva. **E.** Amplificación Selectiva de los fragmentos restringidos.

Fig. 22. Patrón de los vientos alicios a través de Mesoamérica.

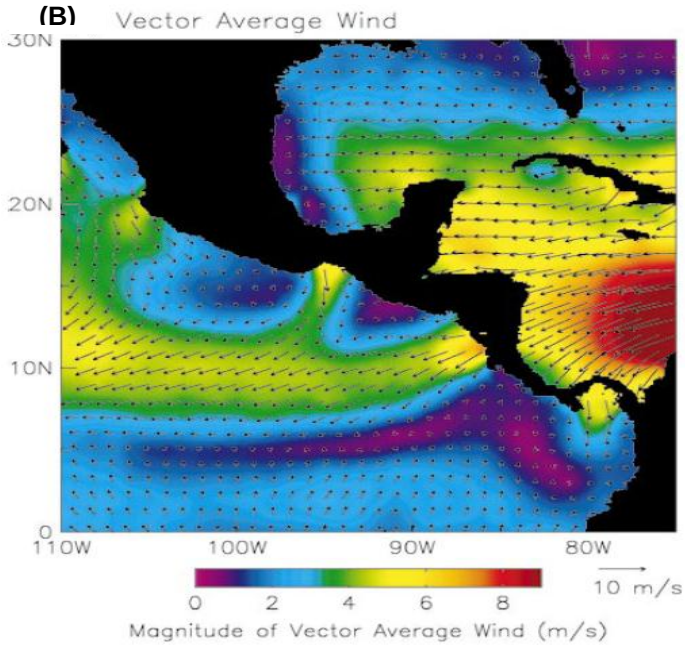
(A)



Vivó, (1964)

Mapa de las medias de direcciones de cientos en Mesoamérica

(B)



Chelton *et al*., (2000)

Mapas de mediciones promedio de vectores de vientos a 10 m. Las estructuras espaciales de las corrientes de vientos se representan por colores

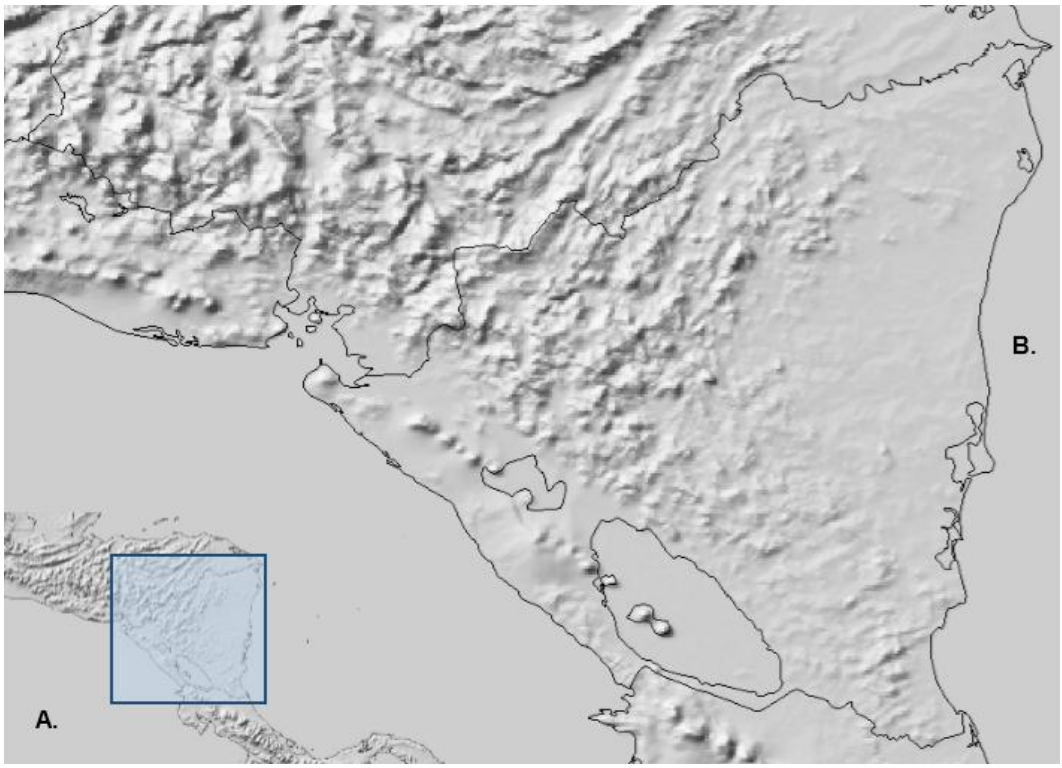


Fig. 23. Mapa del relieve montañoso de Nicaragua. Elaborado por Dávila Alberto. A. Localización del área de interés. **B.** Mapa del relieve montañoso de Nicaragua.

"A pesar de que el código genético es casi universal, el mecanismo necesario para estructurarlo es demasiado complejo para haber surgido de un solo golpe"

Francis Crick, 1981. Life Itself, Its Origin and Nature, p. 71.