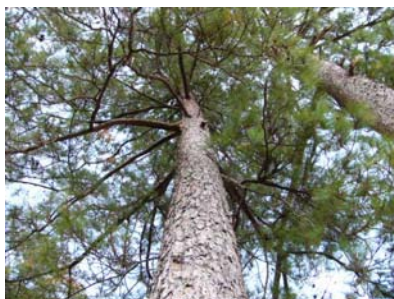


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN-LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA "EDGAR MUNGUÍA ALVAREZ"



**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES
NATURALES *DE Pinus tecunumanii* Eguluz & J. P. Perry DE NICARAGUA
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES RAPDs**

AUTOR:

Br. DAVID ALBERTO CERDA GRANADOS

REQUISITO PREVIO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

TUTORA:

Ph.D. VERÓNICA DÍAZ

LEÓN, NICARAGUA, C. A.

MAYO, 2007

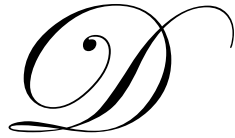
DEDICATORIA

A Dios, que me ha dado la vida.

*A mi padre, José Alberto
y a mi madre Yadira Antonia,
por su apoyo y tolerancia.*

*Y a Verónica, Mi Tutora,
quien es para Mí el modelo
del profesional que deseo ser.*

AGRADECIMIENTOS



Quiero expresar mi más profunda gratitud a la **Vicerectoría de Investigación y Post-Grado**, la cual financió este trabajo con su programa de **Pequeñas Ayudas a la Investigación** con fondos **Asdi/SAREC**. De igual manera, quiero agradecer a mi tutora **Ph.D. Verónica Díaz** por su guía en la elaboración de este trabajo y por enseñarme las técnicas de laboratorio claves para la realización del mismo, a las personas que conocí en los lugares de colecta de muestras; en especial al **Sr. Jerónimo Rayo** de la Reserva Privada Monte Carmelo en La Rinconada de Güisisil y al **Sr. Ricardo Oliú** de la Reserva Genética Forestal Yúcul ambos de Matagalpa, quienes se mostraron muy interesados en este estudio; el cual podrán utilizar en un futuro para la reforestación y conservación de *Pinus tecunumanii*.

Quiero agradecer también al **Sr. Víctor Reyes**, por ayudarme en la colecta de muestras. Con su ayuda las horas en el campo fueron menos agobiantes. A mi amigo **Lic. Domingo Joaquín Guido Novoa**, por auxiliarme en la parte de laboratorio y responder todas mis dudas, su aporte fue muy grande. Gracias amigo. Y al joven **Juan Carlos Castillo** de Estelí, quien me ayudo a ubicar una de las poblaciones de pino y a la recolecta de muestras de esa zona.

Reconocimientos especiales a todas aquellas personas que de alguna y otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo; así mismo, a todas esas personas que me instruyeron a lo largo de mi carrera, me brindaron su amistad y me ayudaron a culminarla exitosamente; en especial a *Lic. César Hernández, Ph.D. Ricardo Rueda, M.Sc. Lourdes Callejas, M.Sc. Rolando Dolmus, M.Sc. Rolando Martínez, M.Sc. Mauricio Prado y Lic. Claudia Silva.*

A todos ustedes...
¡MUCHAS GRACIAS...!!!

INDICE

Lista de tablas	v
Lista de figuras.....	vi
Lista de abreviaturas	vii
Resumen	ix
I. Introducción	- 1 -
II. Objetivos.....	- 5 -
III. Marco Teórico.....	- 7 -
3.1. El Género <i>Pinus</i> en Nicaragua	- 8 -
3.1.1. <i>Pinus tecunumanii</i> Eguiluz & J.P. Perry.....	- 8 -
3.1.2. Ciclo de vida de <i>Pinus</i>	- 13 -
3.1.3. Afectaciones de <i>Dendroctonus frontalis</i> en las poblaciones naturales de <i>Pinus</i> en Nicaragua.....	- 16 -
3.2. Bases genéticas de la evolución	- 19 -
3.2.1. Genética de poblaciones.....	- 19 -
3.2.2. Diversidad genética.....	- 20 -
3.2.3. Fuentes de variabilidad genética	- 21 -
3.2.4. El equilibrio de Hardy-Weinberg	- 25 -
3.2.5. Razones por las que se pierde la diversidad biológica y la variabilidad genética	- 30 -
3.2.6. Preservación y promoción de la variabilidad.....	- 32 -
3.3. Marcadores moleculares	- 33 -
3.3.1. Marcadores bioquímicos	- 34 -
3.3.2. Marcadores de ADN.....	- 35 -
3.4. Marcadores de ADN basados en el uso de enzimas de restricción.....	- 36 -
3.5. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).....	- 38 -
3.5.1. Descripción de la PCR.....	- 38 -
3.5.2. Aplicaciones de la amplificación mediante PCR (Según Huertas, 2004 y Watson et al., 1991).....	- 41 -
3.6. Marcadores de ADN generados por PCR.....	- 43 -
3.7. RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar)	- 43 -
3.8. AFLP (Polimorfismo de la Longitud del Fragmento Amplificado).....	- 46 -
3.9. Microsatélites.....	- 48 -
IV. Materiales y Métodos	- 51 -
4.1. Material vegetal	- 52 -
4.2. Métodos.....	- 54 -
4.2.1. Extracción de ADN Total.....	- 54 -
4.2.2. Amplificaciones del ADN por la técnica RAPD.....	- 55 -

4.3. Análisis de Datos	- 56 -
V. Resultados y Discusión	- 66 -
5.1. Extracción de ADN	- 67 -
5.2. Análisis de patrones de bandas.....	- 68 -
5.2. Diversidad intrapoblacional.....	- 76 -
5.3. Diferenciación entre poblaciones.....	- 82 -
5.4. Relaciones filogenéticas	- 87 -
VI. Conclusiones	- 93 -
VII. Recomendaciones	- 95 -
VIII. Bibliografía	- 97 -
Glosario	- 110 -

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Resumen de Actividades de Control del Gorgojo Descortezador del Pino Realizadas en los Departamentos de Nueva Segovia, Estelí, Madríz, Chinandega, Matagalpa y Jinotega	- 18 -
Tabla 2. Aplicaciones de los Marcadores de ADN.	- 36 -
Tabla 3. Poblaciones de <i>P. tecunumanii</i> de Nicaragua muestreadas	- 53 -
Tabla 4. Designación y secuencia de los 50 cebadores ensayados en tres muestras de ADN de <i>Pinus tecunumanii</i> con la técnica RAPD.	- 57 -
Tabla 5. Diseño del Analisis de Varianza Molecular para este estudio.	- 61 -
Tabla 6. Designación y secuencia de los cebadores empleados.	- 68 -
Tabla 7. Número y porcentaje de bandas polimórficas obtenidas.	- 72 -
Tabla 8. Estimaciones de la diversidad fenotípica intrapoblacional	- 77 -
Tabla 9. Valores de polimorfismo y diversidad en las poblaciones analizadas. -	79 -
Tabla 10. Distribución de la diversidad fenotípica intra e interpoblacional estimada a partir de 11 cebadores en las 5 poblaciones analizadas.	- 83 -
Tabla 11. Resultados del análisis de AMOVA considerando las 5 poblaciones muestreadas	- 85 -
Tabla 12. Valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones	- 85 -
Tabla 13. Matrices de distancias genéticas de Reynolds et al. (1983) y de Nei (1978).	- 88 -

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Pinus tecunumanii</i> Eguiluz & J.P. Perry	- 9 -
Figura 2. Distribución Natural de <i>Pinus tecunumanii</i>	- 11 -
Figura 3. Ciclo vital del pino	- 13 -
Figura 4. Semilla de pino	- 16 -
Figura 5. Poblaciones muestreadas de <i>Pinus tecunumanii</i> de Nicaragua.	- 53 -
Figura 6. ADN total de <i>Pinus tecunumanii</i> de Nicaragua.	- 67 -
Figura 7. Patrones RAPD.....	- 69 -
Figura 8. Representación de las estimaciones de diversidad fenotípica y diversidad génica encontrada con marcadores RAPDs en <i>P. tecunumanii</i>	- 80 -
Figura 9. Análisis Neighbour-joining mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de <i>Pinus tecunumanii</i> utilizando marcadores RAPDs: Árbol obtenido a partir de las distancias genéticas de Reynolds et al. (1983).	- 91 -
Figura 10. Análisis Neighbour-joining mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de <i>Pinus tecunumanii</i> utilizando marcadores RAPDs: Árbol obtenido a partir de distancias genéticas de Nei (1978).	- 92 -

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AFLP	Polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados.
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
CAMCORE	Programa Internacional para la Conservación y Domesticación de Árboles, originalmente Cooperativa de Recursos Coníferos de Centroamérica y México
CMG & BSF	Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales
CTAB	Bromuro trimetil amonio de cetilo
D.	<i>Dendroctonus</i>
dNTP	2'-deoxinucleósido 5' trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
g.l	Grados de libertad
l.	<i>Ips</i>
IUCN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
Kb	kilopares de bases
M	Molar
mM	Milimolar
msnm	Metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
NTSYS	Sistema de análisis multivariado y taxonomía numérica
OFI	Instituto Forestal de Oxford
P.	<i>Pinus</i>
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RGAP	ADN polimórfico análogo a genes de resistencia
RT-PCR	PCR en unión con la transcripción reversa
rpm	Revoluciones por minuto
ssp.	Subespecie
TAE	Tris acetato EDTA
TE	Tris EDTA
TPFGA	Herramientas para los análisis de genética de poblaciones
Tris	2-amino-2 (hidroximetil)-1-1-3-propanodiol
U	Unidades de enzima
UAH	Universidad de Alcalá de Henares

UTM	Universal transversal de Mercator
UV	Ultravioleta
V	Voltio
var.	Variedad
µg	Microgramo
µl	Microlitro

RESUMEN

Pinus tecunumanii es un árbol de mucha importancia industrial por su madera preciosa, por su crecimiento acelerado y alto rendimiento; hecho que ha quedado en evidencia en numerosos ensayos internacionales de procedencias. Las poblaciones nicaragüenses de esta especie se encuentran al límite sur de su distribución natural, y debido a que están adaptadas a particulares condiciones ecológicas, diferentes a las de las poblaciones en el centro de su distribución, se consideran recursos genéticos valiosos. En los últimos años, las poblaciones naturales de Nicaragua han sido seriamente afectadas por actividades humanas extensivas, desastres naturales (huracán Mitch en 1998), incendios y plagas como *Dendroctonus frontalis* (gorgojo descortezador en 1998-2001). Como consecuencia, los tamaños de las poblaciones de *P. tecunumanii* han sido drásticamente reducidas y se considera que también su diversidad genética, lo que constituiría una seria amenaza a su capacidad de adaptación a los cambios ambientales a mediano y largo plazo y por lo tanto al desarrollo de estos bosques. El conocimiento de las estructuras poblacionales y la diversidad genética de la especie se requiere para diseñar estrategias de uso sostenible, conservación y reforestación. El ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) fue usado para evaluar y estimar la variación genética entre y dentro de cinco poblaciones de Nicaragua. El porcentaje medio de bandas polimórficas tomando en cuenta el total de bandas fue de 80.40%, la diversidad fenotípica media y la diversidad génica media fueron similares, 0.382 y 0.373, respectivamente, las cuales son similares a las encontradas en otras de especies coníferas. Por otro lado, los valores de los índices de diferenciación interpoblacional (G_{ST}) y el análisis de varianza molecular (AMOVA) encontraron que la diferenciación genética entre poblaciones es muy baja ($G_{ST} = 0.062$ [6.2%] y índice de diferenciación entre poblaciones (Φ_{ST}) = 0.072 [7.2%]) lo que evidencia que aún existe flujo génico entre ellas. El 93.8% (valor correspondiente a la diversidad dentro de poblaciones [H_{POP}/H_T] = 0.938) y 92.9%, (según AMOVA) de la variación genética total se encontró en los individuos dentro de las poblaciones. Dado que la mayor diversidad genética está dentro de las poblaciones, como es característico en las gimnospermas, en la medida que se reduce el tamaño de las poblaciones se reduce la diversidad genética, por lo que los planes de manejo de *P. tecunumanii* en Nicaragua, deberían de ayudar a mantener los altos grados de diversidad en las poblaciones individuales que aun se detectan en estas poblaciones, deteniendo y evitando la continua reducción de sus tamaños.



Pinus tecunumanii Egüiluz & J. P. Perry (Pinaceae) es un árbol de mucha importancia industrial de crecimiento acelerado y alto rendimiento, ya que su madera sirve para construcción en general, (Gillespie, 1992). Debido a que *P. tecunumanii* se encuentra al límite sur de su distribución en Nicaragua, las poblaciones nicaragüenses son de mucha importancia genética.

P. tecunumanii es una de las mejores especies de pino de América en cuanto a su potencial genético y productivo por lo que constituye un recurso forestal muy valioso, hecho que ha quedado en evidencia en los ensayos internacionales de procedencias (Styles, 1994), como los realizados por el Instituto Forestal de Oxford en 1990, donde las poblaciones de Yúcul, Las Camelias y San Rafael del Norte fueron sobresalientes en productividad y forma del fuste (Gibson, 1994). De estas procedencias, la mejor de Nicaragua es la de Yúcul (Matagalpa) con un área de 337.22 ha, la cual fue declarada Reserva Genética Forestal (Rasmussen, 1994).

La diversidad genética resulta de la cantidad de variabilidad genética entre individuos y se pueden manifestar en diferencias en la secuencia del ADN, en características bioquímicas, en propiedades fisiológicas o en caracteres morfológicos (Ramanatha y Hodgkin, 2002). La variación genética es de fundamental importancia en muchas áreas de biología básica y aplicada, ya que provee la base para la adaptación y evolución de poblaciones y especies. Por consiguiente, el mantenimiento de la variación genética es un objetivo importante para la conservación de la biodiversidad (Kraft y Säll, 1999 y Thomas et al., 1999).

Científicos y manejadores han mostrado gran preocupación por la potencial pérdida de la diversidad genética en especies de árboles forestales manejadas comercialmente. De hecho, la conservación de la diversidad genética puede ser uno de los problemas más importantes que influyen en las prácticas forestales del futuro (Thomas et al., 1999), por lo tanto, ha habido un creciente interés en estudiar la variación genética en gran cantidad y variedad de poblaciones y

especies a través de marcadores moleculares basados en ADN. El desarrollo de tales sistemas de marcadores como los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), el ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD), el polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP) y microsatélites, en particular, han hecho posible acceder al patrón de variación virtualmente en cualquier organismo (Kraft y Säll, 1999).

La técnica RAPD está basada en la amplificación al azar de diferentes fragmentos de ADN con un solo cebador de 10 nucleótidos de largo que identifica polimorfismos que son usados como marcadores (Williams et al., 1990); para caracterizar o evaluar la diversidad genética, como se ha hecho en los pinos de cono cerrado de California (Wu et al., 1999), en *Pinus longaeva* (Lee et al., 2002) y en *Pinus oocarpa* de Nicaragua (Díaz et al., 2001), para construir mapas de ligamiento genético como por ejemplo en *Eucalyptus nitens* (Byrne et al., 1995) y *Quercus robur* L. (Barreneche et al., 1998), y mapas genómicos como en *Pinus pinaster* (Plomion et al., 1995), entre otras aplicaciones.

Posterior al Huracán Mitch (Octubre de 1998), la ocurrencia de incendios, los cambios frecuentes de temperatura (Fenómeno “Niño”) y el manejo inadecuado del bosque, provocaron el crecimiento de la población de *Dendroctonus frontalis*, el gorgojo descortezador del pino (Comisión Sectorial del Medio Ambiente, 2001), cuya plaga atacó intensamente los pinares de Nicaragua hasta el 2001.

El recurso pinos (principalmente de Nueva Segovia), constituye un fuerte componente de la producción forestal del país. En esta región, según un reporte del INAFOR de la Delegación de Nueva Segovia, el ataque de *D. frontalis* redujo la cobertura forestal de las coníferas en un 50% lo que provocó que se declarara Estado de Desastre Ambiental en este Departamento. En los Departamentos de Nueva Segovia, Estelí, Madriz, Chinandega, Matagalpa y Jinotega se detectaron hasta mayo del 2002, 749 brotes de *D. frontalis* (32,581.13 ha) de los cuales se

trataron 737, tumbándose 307,829.00 árboles equivalente a 78,917.44 m³ de volumen (INAFOR, 2002), produciendo efectos directos sobre el ambiente como, erosión del suelo y pérdida del recurso agua, sobre la diversidad genética (erosión genética) e indirectos sobre el sistema de reproducción y dispersión de semillas de las especies. A esto se le puede agregar la sobreexplotación para la comercialización de la madera y el avance de la frontera agrícola ante la demanda de tierra para uso inmediato en una población en continuo crecimiento.

Debido a que la drástica reducción en el tamaño de las poblaciones de *P. tecunumanii*, implica también, la reducción de su variabilidad genética y por lo tanto de su fitness reproductivo (reproducción y sobrevivencia) La sobrevivencia y recuperación de las poblaciones de *P. tecunumanii*, a largo plazo dependerá de la cantidad de variación genética que aún posean. Por estas razones, es pertinente evaluar la diversidad genética de las poblaciones de *P. tecunumanii*; ya que esto permitirá cuantificar y conocer la distribución de la variación genética y así determinar su potencial evolutivo adaptativo y recomendar medidas para su conservación, identificando las mejores procedencias como fuentes semilleras para proyectos de conservación, reforestación, manejo de plantaciones comerciales y mejora genética.



II

Objetivos

2.1. Objetivo General:

- ❖ Evaluar la diversidad genética de cinco poblaciones de *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry, de Nicaragua mediante el uso de marcadores RAPDs.

2.2. Objetivos Específicos:

- ❖ Estimar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de *P. tecunumanii*.
- ❖ Determinar las relaciones filogenéticas entre las cinco poblaciones estudiadas de *P. tecunumanii*.



III

Marco Teórico

3.1. El Género *Pinus* en Nicaragua

El género *Pinus* (familia Pinaceae) es uno de tres géneros de gimnospermas que se encuentran en Nicaragua. Se diferencia fácilmente por el hecho de que las hojas en forma de aguja (acículas) nacen en fascículos de 2-6 rodeadas por vainas basales de bráctea. Tienen conos que consisten de escamas que se ponen duras y leñosas a la madurez. Cada escama produce 2 semillas aladas (Styles, 1994).

Las cuatro especies de pino que se encuentran en Nicaragua (según Stevens et al., 2001) son:

1. *Pinus caribaea* Morelet var. *hondurensis* (Sénécl.) Barr. & Golf.
2. *Pinus maximinoi* H.E. Moore
3. *Pinus oocarpa* Schiede ex Schltdl var. *oocarpa*
4. *Pinus tecunumanii* Eguluz & J.P. Perry

3.1.1. *Pinus tecunumanii* Eguluz & J.P. Perry.

Familia: Pinaceae Lindl.

Especie: *Pinus tecunumanii* Eguluz & J.P. Perry

Sinónimos: *Pinus patula* ssp. *tecunumanii* (Eguluz & J.P. Perry) Styles, *Pinus oocarpa* var. *ochoterenae* Martínez.

Nombre Común: Pino tecun uman, pino, ocote.

Según Stevens et al. (2001) y Styles,(1994), las principales características de esta especie son:

Árbol: *Pinus tecunumanii* son árboles 30-40 (-45) m de alto y 50-90 (-110) cm de diámetro, corona clara, con algunas ramas delgadas, más o menos

ascendentes o laterales; ramas jóvenes con brotes pruinosos, fuste recto a veces con engrosamientos nodales. Véase Figura 1 (a).

Corteza: áspera y fisurada en la base del fuste, lisa y más delgada hacia arriba, grisácea, exfoliante en escamas, placas o tiras papiráceas, dejando manchas rojizo-anaranjadas por debajo. Véase Figura 1 (b).

Hojas: Follaje delgado, patente o más o menos péndulo, verde claro; acículas generalmente 4 por fascículo, a veces 3 ó 5, 14-25 cm de largo, vaina de las agujas de 10-22 mm de largo; canales resiníferos 2-3, casi siempre medios, raramente internos. Véase Figura 1 (c).

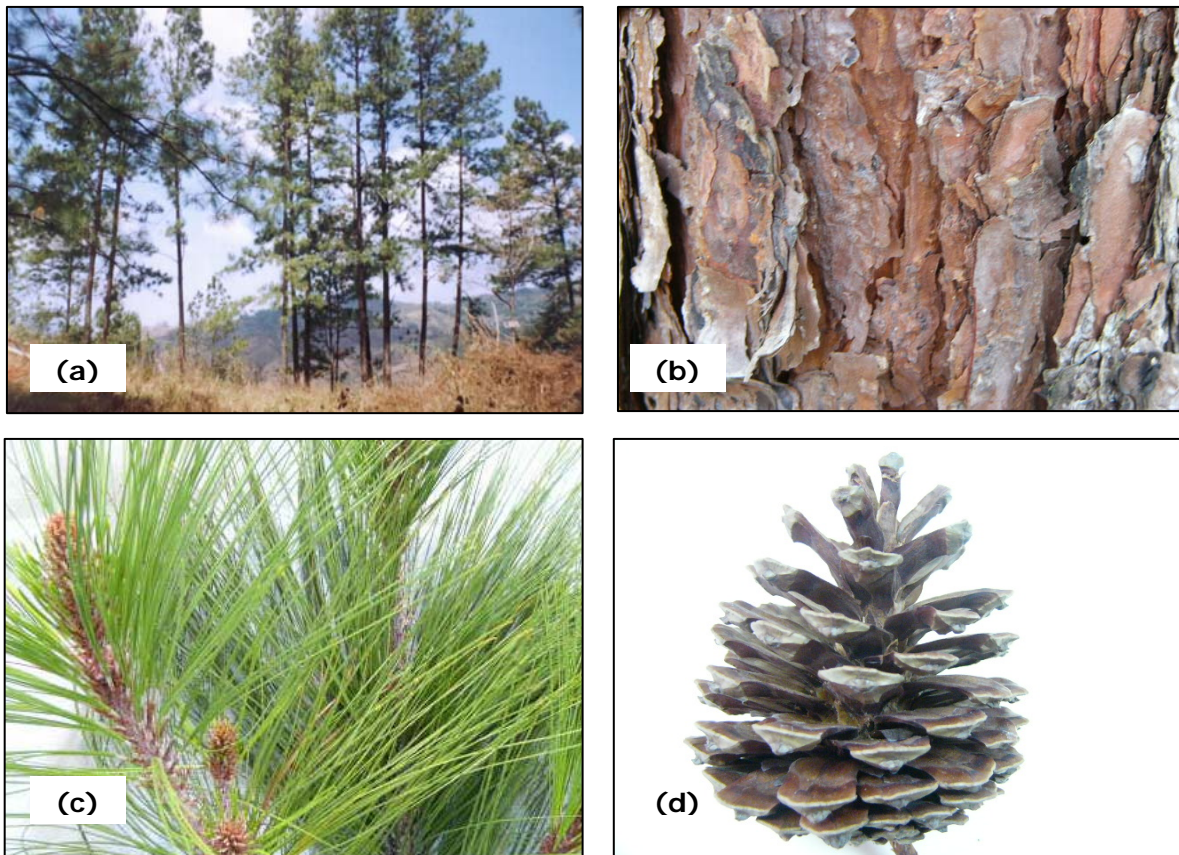


Figura 1. *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J.P. Perry: (a), árboles en Yúcul-Matagalpa; (b), corteza; (c), acículas; (d), cono. (Fotos por David Cerda)

Conos: Angostamente cónicos, 4-8 cm de largo y 3-5 cm de ancho, solitarios o en pares, o a veces en fascículos verticilados de 4 o más, persistentes, pedúnculos de hasta 2 cm de largo, más raramente sésiles o subsésiles, escamas angostas con apófisis prominentes, a veces con un acúleo proyectado hacia delante. Véase Figura 1 (d).

Usos: *P. tecunumanii* ha sido plantado por lo general como una especie industrial de crecimiento acelerado y alto rendimiento. La madera es de menor densidad y fortaleza que muchas coníferas de áreas templadas, pero es adecuada para construcción en general. La madera es de blanca a blanca amarillenta, con un duramen rosáceo y posee a menudo un fuerte contraste entre la madera más temprana de color claro y la madera tardía más oscura. La fortaleza y la densidad de la madera aumentan de manera marcada del centro hacia fuera, de manera que la madera exterior es apropiada para trabajos estructurales generales, mientras que la madera juvenil interior es más apropiada para la manufactura de cajas y contenedores grandes, tablillas para el techado y ensambladura de bajo costo. La madera se puede tratar con facilidad, es relativamente no resinosa y con poco olor, y es apropiada tanto para los tableros de partículas como pulpa (Gillespie, 1992).

P. tecunumanii se encuentra distribuida de manera natural desde las tierras altas al sur de México (Chiapas y Oaxaca) hasta el oeste de Nicaragua (Gillespie, 1992 y Stevens et al., 2001), con una distancia aproximada de 1000 Km (Véase Figura 2). Varios taxonomistas sugieren que el *P. tecunumanii* se extiende por el oeste hasta Oaxaca y Guerrero, en México. Sin embargo, el examen del ADN de árboles de estas zonas, utilizando marcadores moleculares, indica que están emparentados con el *P. patula* y el *P. herrerae* y no con el *P. tecunumanii* (Dvorak et al., 2001).

En Nicaragua se encuentra comúnmente en sitios fértiles en valles o caños en la zona norcentral 650-1,500 msnm. Conos maduros en enero-febrero. Esta

especie prefiere suelos ácidos, arenosos, derivados de rocas basálticas o andesitas, con drenaje libre y una precipitación anual de 1,400 mm, donde tiende a formar pequeños pinares puros o mezclados con *P. oocarpa* ssp. *oocarpa*. A mayores altitudes tiende a mezclarse con *P. maximinoi* y bosques macrofilos. A elevaciones bajas, hasta 700 msnm, se le puede encontrar junto con *P. caribaea* var. *hondurensis* (Stevens et al., 2001).

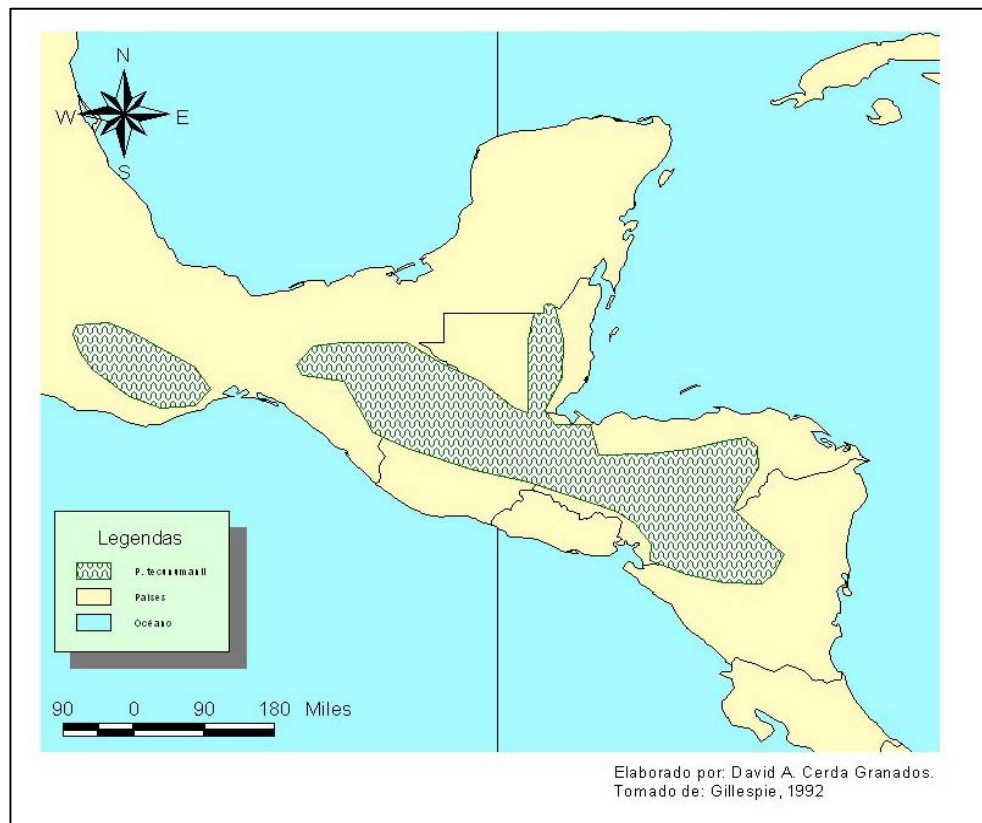


Figura 2. Distribución Natural de *Pinus tecunumanii*

3.1.1.1. *Pinus tecunumanii* uno de los mejores pinos de América

El *Pinus tecunumanii* ha sido uno de los pinos tropicales más intensamente estudiados en las dos últimas décadas. CAMCORE – cuando aún se denominaba “Central America and Mexico Coniferous Resources” –, de la Universidad del

Estado de Carolina del Norte de USA, comenzó sus primeras recolecciones de semillas de procedencias de *P. tecunumanii* en América Central en marzo de 1981. Desde entonces, CAMCORE ha muestreado 1,473 árboles de 48 poblaciones de *P. tecunumanii* por todo el sur de México y Centro América (Dvorak et al., 2001 y Hodge y Dvorak, 1999).

El *P. tecunumanii* no mejorado genéticamente crece un promedio de 14m³/ha/año en Venezuela y Brasil, 15m³/ha/año en Sudáfrica y 25m³/ha/año en Colombia con mediciones realizadas a los 8 años de edad (Dvorak et al., 2001 y Hodge y Dvorak, 1999). En el centro de Brasil *P. tecunumanii* crece con un ritmo similar al de buenas procedencias de *P. caribaea* var. *hondurensis*. En áreas subtropicales del sur de Brasil las buenas procedencias de *P. tecunumanii* producen, más o menos un 15% más en volumen que el *P. taeda* mejorado genéticamente. Tanto en Colombia como en Sudáfrica, el *P. tecunumanii* presenta un mejor crecimiento y desarrollo que el *P. patula* en estaciones más tropicales de baja altitud (Dvorak et al., 2001).

3.1.1.2. Unas de las mejores procedencias de *Pinus tecunumanii* de América son de Nicaragua

De las 48 procedencias de *P. tecunumanii* ensayadas por CAMCORE, 30 son de altitudes elevadas (AE) de 1,500 a 2,900 msnm y 18 de altitudes bajas (AB) de 450 a 1,500 msnm. La evaluación de 78 de los ensayos más antiguos de CAMCORE indica que Montebello (Chiapas) en México y San Jerónimo en Guatemala, son las procedencias más productivas de AE. Villa Santa en Honduras y **San Rafael del Norte** y **Yúcul** en Nicaragua, resultaron las mejores procedencias de AB. **Las Camelias** y **Apante**, de Nicaragua, mostraron también un buen potencial, seguidas por las procedencias de Honduras de Culmí, San Esteban y San Francisco (Dvorak et al., 2001).

3.1.2. Ciclo de vida de *Pinus*

Todas las gimnospermas son heterosporas y producen dos tipos diferentes de esporas en dos tipos diferentes de esporangios. Las esporas que originan los gametofitos masculinos se conocen como microsporas y se forman en estructuras conocidas como microsporangios. Las esporas a partir de las cuales se desarrollan los gametofitos femeninos, se conocen como megasporas y se forman en los megasporangios. Un megasporangio contiene una sola célula madre de la megaspora, que origina, por meiosis, a una megaspora, y está rodeada por una o dos capas de tejido, el tegumento (Curtis y Barnes, 2000). Véase el ciclo de vida del pino en Figura 3.

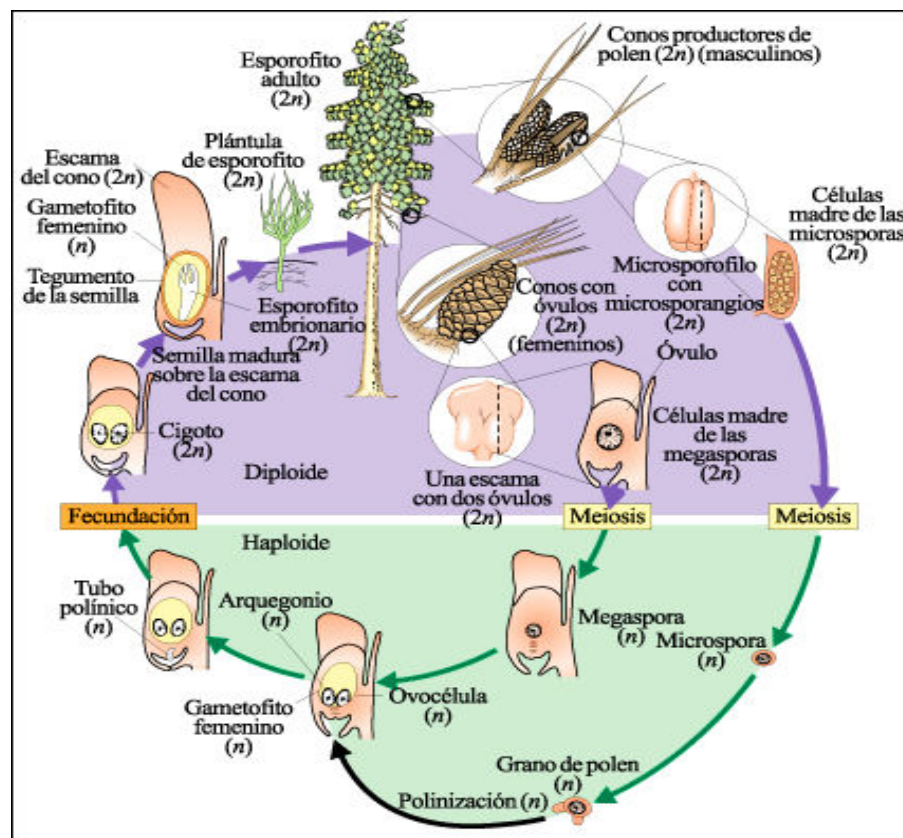


Figura 3. Ciclo vital del pino (Tomado de Curtis y Barnes, 2000)

En un árbol de pino, el esporofito maduro tiene dos tipos de conos, que producen los dos tipos de esporas. Los pequeños conos, masculinos, se asemejan superficialmente a los de los licopodios (pequeños, alargados y de textura un poco blanda). Los conos femeninos, en cambio, son grandes y tienen hojas modificadas en forma de escamas (los esporofilos) portadoras de óvulos, que son mucho más gruesas y rígidas que los esporofilos de los conos masculinos (Fuller et al., 1974 y Curtis y Barnes, 2000). Los árboles de pino son monoicos, es decir, un mismo árbol tiene conos masculinos y femeninos, por lo que son frecuentemente autopolinizados, aunque la polinización cruzada es estimulada por la posición relativa de los estróbilos masculinos y femeninos en las ramas de un árbol (Farjon y Styles, 1997).

En los conos masculinos, las células madres de las microsporas sufren meiosis y producen microsporas haploides. Cada microspora se diferencia en un grano de polen microscópico, un gametofito masculino inmaduro. Como el viento es el que disemina los granos de polen y lo hace al azar, las plantas polinizadas por el viento se caracterizan, en general, por producir polen en grandes cantidades (Fuller et al., 1974).

Dentro de los óvulos de los conos femeninos, la célula madre de las megasporas sufre también meiosis. De las cuatro células producidas dentro del óvulo en cada secuencia meiótica, tres se desintegran y la restante (la megaspora) se desarrolla en un diminuto gametofito femenino. Este gametofito haploide crece dentro del óvulo y desarrolla dos o más arquegonios, cada uno de los cuales contiene una sola ovocélula. El desarrollo desde la megaspora hasta el gametofito con sus ovocélulas puede invertir varios meses o poco más que un año (Fuller et al., 1974 y Curtis y Barnes, 2000).

Cuando el óvulo madura, secreta un líquido pegajoso que alcanza las escamas del cono. Los granos de polen, capturados en el líquido pegajoso, son atraídos hacia el óvulo a medida que el líquido se seca. En este sitio,

aproximadamente tres meses después, el grano de polen se desarrolla en un gametofito masculino maduro. Este gametofito produce dos células inmóviles, los gametos masculinos. Estos son llevados hacia la ovocélula dentro del tubo de polen, que es producido por el gametofito masculino y crece lentamente a través de los tejidos del óvulo, proceso que tarda casi un año (Curtis y Barnes, 2000). El ciclo reproductivo del pino generalmente tarda dos años y medio para completarse.

Dado que el polen es llevado a los conos femeninos por el viento y los gametos masculinos son llevados a la ovocélula por el tubo de polen, los pinos y otras coníferas no dependen del agua libre para la fecundación. Así, pueden reproducirse sexualmente cuando y donde los helechos y las briofitas no pueden hacerlo. Esta ha sido, pues, una de las grandes innovaciones evolutivas en el desarrollo de las plantas vasculares (Fuller et al., 1974).

Después de la fecundación, el cigoto comienza a dividirse y forma el embrión o esporofito joven. A medida que el óvulo madura, su tegumento se endurece y forma una cubierta seminal, que encierra tanto al embrión como al gametofito femenino (este último le proporciona alimento al embrión cuando germina la semilla). Después que el cono madura, se abre y libera sus semillas; esto ocurre típicamente en el otoño del segundo año, luego de la aparición inicial de los conos. En la mayoría de las coníferas, las semillas son aladas y son dispersadas por el viento (Curtis y Barnes, 2000). En ciertas especies de pino adaptadas al fuego, los conos permanecen cerrados hasta que en presencia de fuego se abren, por lo que el fuego moderado facilita la germinación de las semillas.

La cubierta de la semilla y el ala que la lleva nacen del tegumento endurecido del óvulo, que deriva del esporofito materno. La cubierta de la semilla rodea al tejido del gametofito femenino; hinchado y compactado con reservas de alimento almacenadas, el tejido del gametofito crece y desplaza al tejido del

megasporangio original. En la parte más interna de la semilla se encuentra el embrión con sus varios cotiledones, es decir, hojas seminales, que aparecerán como las primeras hojas del vástago del nuevo esporofito cuando germine la semilla. De la parte inferior del embrión se desarrollará la primera raíz (Fuller et al., 1974 y Curtis y Barnes, 2000). Véase corte longitudinal de una semilla de pino en Figura 4.

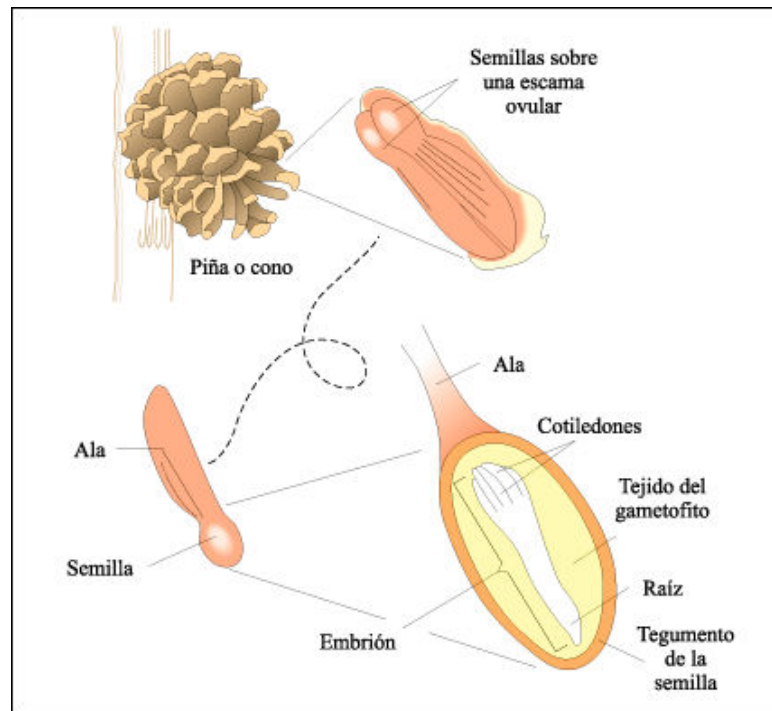


Figura 4. Semilla de pino (Tomado de Curtis y Barnes, 2000)

3.1.3. Afectaciones de *Dendroctonus frontalis* en las poblaciones naturales de *Pinus* en Nicaragua.

Según Billings et al. (2004), los 3.8 millones de hectáreas de pinares nativos (*Pinus* spp.) de América Central han estado sometidos mucho tiempo a las amenazas de diversos agentes destructivos como huracanes, sequías, incendios, actividades humanas y plagas forestales. La combinación de estos factores ha tenido en años recientes efectos negativos sobre los recursos forestales de la región.

Los mismos autores señalan que en Nicaragua, 318,000 ha están clasificadas como pinares y se sitúan principalmente en el Departamento de Nueva Segovia a lo largo de la frontera con Honduras. También afirman que el fenómeno climático llamado El Niño, a mediados de los años 1990, produjo condiciones de sequía y acumulación de combustible, con los consiguientes incendios forestales graves en 1998. En Octubre del mismo año, el huracán Mitch llevó fuertes vientos y lluvias a América Central, causando inundaciones y avalanchas de barro que devastaron aldeas, bosques e infraestructuras siendo los países más afectados Nicaragua y Honduras. Esto dejó vulnerables a las poblaciones de pino por lo que de 1998 a enero de 2002, el *Dendroctonus frontalis* destruyó más de 30,000 ha de pinares nicaragüenses. En mayo de 2001 se organizó la lucha contra esta plaga, con fondos de emergencia y asistencia técnica facilitada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés) y ulteriormente por el Gobierno de Nicaragua. Las pérdidas potenciales se redujeron estableciendo anchas fajas de separación para frenar la propagación de las grandes infestaciones y mediante la corta *in situ* en el caso de las infestaciones menores. Aunque terminó en Nicaragua en diciembre de 2001, la plaga continuó intensamente en los bosques contiguos de Honduras en 2002 por la demora de este país en sus medidas de control.

Según un informe del INAFOR, en los Departamentos de Nueva Segovia, Estelí, Madriz, Chinandega, Matagalpa y Jinotega se realizó control del gorgojo descortezador del pino, tal y a como se refleja en la Tabla 1. El acceso a las infestaciones en Nicaragua se complicó por la presencia de minas antipersonales en la frontera con Honduras desde el conflicto de los años ochenta. Al estar saturados los mercados locales y de exportación para los árboles víctimas del gorgojo, la mayor parte de éstos y de los talados en las fajas de separación se dejaron sobre el terreno. Creció así mucho el riesgo de incendios en toda la zona, y en efecto, en abril de 2003 se declararon devastadores incendios en la región afectada, que se extendieron a más de 8,000 ha. El fuego anuló gran parte de la regeneración natural de pinos que se había operado desde que se dominó la

plaga del gorgojo en 2001. Como reacción contra las catástrofes recientes, se ha promulgado una nueva ley forestal y se ha formulado un plan estratégico nacional contra incendios y plagas que ahora se está aplicando (Billings et al., 2004).

Se han registrado ataques de *Dendroctonus spp.* en los años 1964-66, 1975-77, 1984-85 y 1992-93. Otros gorgojos de los géneros *Ips* también pueden causar pérdidas a los pinares de Nicaragua, siendo los más comunes el *Ips calligraphus* e *I. grandicollis*. Por lo general estas especies juegan un papel secundario, prefiriendo atacar árboles cortados o muy debilitados. Sin embargo, el gorgojo descortezador (*D. frontalis*) sigue siendo el insecto más destructivo en los pinares de Honduras y Nicaragua (Comisión Sectorial del Medio Ambiente, 2001).

Esta plaga en Nicaragua siempre ha existido en poblaciones bajas y son controladas con los métodos directos o mecánicos en un tiempo oportuno para evitar mayores daños, pero como se mencionó anteriormente, posterior al Huracán Mitch, la ocurrencia de incendios, los cambios frecuentes de temperatura (Fenómeno “Niño”) y el manejo no adecuado del bosque, fueron los factores que influyeron en el crecimiento de la población de insectos (Comisión Sectorial del Medio Ambiente, 2001).

Tabla 1. Resumen de Actividades de Control del Gorgojo Descortezador del Pino Realizadas en los Departamentos de Nueva Segovia, Estelí, Madriz, Chinandega, Matagalpa y Jinotega

Departamento	Brotos Detectados	Brotos Tratados	Área Tratada (ha)	Árboles Tumbados	Vol m3 Tumbados	Área Afectada
Nueva Segovia	620	608	1,083.77	258,813.00	65,470.16	32,359.19
Estelí	49	49	94.36	19,691.00	4,715.20	94.36
Madriz	31	31	27.38	6,462.00	2,009.98	27.38
Chinandega	6	6	4.48	330.00	92.70	4.48
Matagalpa	17	17	39.21	9,763.00	2,397.40	39.21
Jinotega	26	26	56.51	12,770.00	4,232.00	56.51
Total	749	737	1,305.71	307,829.00	78,917.44	32,581.13

Fuente: Instituto Nacional Forestal (INAFOR). Proyecto POSAF. 2002

3.2. Bases genéticas de la evolución

3.2.1. Genética de poblaciones

Estudiar la evolución, contemplando el proceso desde el punto de vista de un gen ha probado ser una herramienta enormemente eficaz. En particular, los biólogos evolucionistas han hecho un uso excelente de las herramientas de una rama de la genética conocida como **genética poblacional** (o de poblaciones), que estudia la frecuencia, distribución y herencia de los alelos en las poblaciones (Audesirk et al., 2003). La genética de poblaciones es una síntesis de la teoría darwiniana de la evolución con los principios de la genética mendeliana. Para el genetista de poblaciones, una **población** es un grupo de organismos que se cruzan, definidos y unidos por su reservorio génico. La evolución es el resultado de los cambios acumulados en la composición del reservorio génico (Curtis y Barnes, 2000).

En la genética poblacional, la **poza génica**, o de genes (*gene pool*) (Audesirk et al., 2003) o bien el **reservorio génico** o **acervo génico** como le dicen otros autores, se define como la **suma de todos los genes de una población**. Es decir, el acervo génico se compone de todos los alelos de todos los genes de cada uno de los individuos de esa población. También se puede considerar que cada gen en particular tiene su propia poza génica, que se compone de todos los alelos de ese gen específico en una población. Si se suman los alelos de ese gen en la totalidad de los individuos de una población, se puede determinar las proporciones relativas de los diferentes alelos, lo que se conoce como **frecuencia de alelos** (Curtis y Barnes, 2000).

El genetista de poblaciones, examina una población y ve una poza génica que simplemente resulta estar dividida en los paquetes que se conocen como organismos individuales. Por tanto, todo cambio fenotípico que se observa en los

individuos que componen la población también puede ser visto como la expresión externa de cambios fundamentales en el reservorio génico. Por consiguiente, el genetista poblacional define la **evolución como los cambios en las frecuencias de alelos** que se producen en un reservorio génico a través del tiempo. La evolución no es más que un cambio en la constitución genética de las poblaciones, a lo largo de las generaciones (Audesirk et al., 2003).

3.2.2. Diversidad genética

La diversidad genética es la variedad de alelos y genotipos presentes en un grupo bajo estudio (población, especie o grupo de especies) (Frankham et al., 2002). La diversidad genética es lo que hace que algunas especies de plantas y animales presenten diferentes propiedades fisiológicas (sean más resistentes al estrés abiótico que otras como a temperaturas extremas, eventos de sequía, cambios en la disponibilidad de alimentos o a factores bióticos como enfermedades, plagas y otros (Ramanata y Hodgking, 2002 y Bird y Molinelli, 2001). Estos autores consideran que mientras mayor diversidad genética posea una especie, mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones, por lo que, una especie que exhibe poca diversidad genética es más vulnerable a la extinción.

Existen cuatro componentes de la diversidad genética que pueden ser distinguidos: (1) el número de diferentes formas alélicas encontradas en diferentes poblaciones, (2) su distribución, (3) el efecto que las diferentes formas alélicas tienen sobre la función o el desempeño del individuo y (4) la distinción total entre diferentes poblaciones. La variación que sustenta la diversidad genética se origina principalmente de la mutación y la recombinación, luego la deriva genética, el flujo de genes y la selección que actúan sobre los alelos. En general, se considera que la variación genética en poblaciones de plantas está estructurada en el espacio y en el tiempo. La descripción de la extensión y distribución de la diversidad genética en una especie y de la forma en la cual está estructurada, es un

prerrequisito esencial para determinar, qué conservar, dónde y cómo conservar (Ramanatha y Hodgking, 2002).

Con respecto a la importancia de la diversidad genética, que es uno de los objetivos principales en la biología de la conservación, en primer lugar, se considera que el cambio ambiental es un proceso continuo y la diversidad genética es requerida para que las poblaciones evolucionen y se adapten a tales cambios. En segundo lugar, que la pérdida de la diversidad genética está a menudo asociada con endogamia y reducción en el fitness reproductivo (Frankham et al., 2002). De la cantidad de diversidad depende el éxito evolutivo de las especies y por extensión la sobrevivencia humana.

En general, el nivel de diversidad genética de una especie vegetal depende de varios factores tales como su biología reproductiva, tipo de cruzamiento (autofecundación o reproducción cruzada), o dispersión de polen y semillas (por el viento, por animales, por insectos, por gravedad). También influye si la planta es perenne o anual, el porte de la misma, si es arbórea o arbustiva, y la distribución de la especie, es decir, si está ampliamente distribuida o si presenta una distribución restringida (endémica). Así, las especies alógamas (con reproducción cruzada), generalmente, presentan una mayor diversidad genética que las especies autógamias (con autofecundación), ya que la reproducción cruzada genera variabilidad genética, produciendo una mayor diversidad genética intrapoblacional (González y Sosa, 2002).

3.2.3. Fuentes de variabilidad genética

Las fuentes de la diversidad genética son: la meiosis y la mutación. Las mutaciones que ocurren al azar a lo largo de millones de años son la fuente última de la variabilidad genética de las poblaciones de organismos que existen hoy en día. Sin embargo, la variabilidad genética de una generación a la siguiente en una especie, depende de la meiosis (Audesirk et al., 2003).

3.2.3.1. Diversidad genética por meiosis

La meiosis origina diversidad genética mediante dos mecanismos. Uno de los mecanismos es la distribución aleatoria de homólogos maternos y paternos a las células hijas, que ocurre cuando los homólogos apareados se alinean en el ecuador de la célula en la metafase I de la meiosis I. Otro de los mecanismos es el entrecruzamiento que produce cromosomas con combinaciones de alelos que difieren de las de cualquiera de los progenitores. De hecho, es posible que estas nuevas combinaciones no hayan existido *jamás* hasta ahora. El último mecanismo por el que la reproducción sexual genera variedad se aplica en la fecundación. Dos gametos, cada uno probablemente con combinaciones únicas de alelos, se fusionan para formar un hijo diploide (Audesirk et al., 2003).

3.2.3.2. Diversidad genética por mutación

Los cambios en la secuencia de bases del ADN se llaman *mutaciones*. Una posibilidad para que se produzca una mutación es que ocurra un error en el apareamiento de bases durante la replicación, cuando la célula se prepara para dividirse. También pueden ocurrir cambios de bases espontáneamente. Además, ciertas sustancias químicas, como por ejemplo, las aflatoxinas, que sintetizan ciertos tipos de radiación, como los rayos X y los rayos ultravioleta de la luz solar, aumentan la frecuencia de los errores de apareamiento de bases durante la replicación, e incluso inducen cambios en la composición del ADN entre una replicación y otra (Audesirk et al., 2003). Estos cambios pueden tener lugar en cualquier zona del ADN. Si esto se produce en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido particular, éste puede presentar un aminoácido cambiado en la cadena polipeptídica. Esta modificación puede alterar seriamente las propiedades de la proteína resultante. Cuando se produce una mutación durante la formación de los gametos, ésta se transmitirá a las siguientes generaciones (Biblioteca de Consulta Microsoft® Encarta® 2002).

Según Fontdevila y Moya, (1999) se pueden clasificar las mutaciones de la siguiente manera:

A. Mutación por cambios puntuales.

Es la que ocurre por la sustitución de una base nucleotídica por otra. Existen doce posibles sustituciones: cuatro, denominadas *transiciones*, que sustituyen una purina por otra purina ($A \leftrightarrow G$) o una pirimidina por otra pirimidina ($C \leftrightarrow T$), y ocho, llamadas *transversiones*, que sustituyen una purina por una pirimidina, o viceversa ($A, G \leftrightarrow C, T$).

B. Mutación por reestructuración en el ADN

Las mutaciones más importantes de este tipo son la multiplicación repetitiva y las inserciones por transposición. La primera conduce a la presencia en el genoma de secuencias de ADN repetidas, en mayor o menor grado. La longitud de cada unidad repetitiva (repetición) es variable, desde unos pocos nucleótidos a secuencias génicas completas codificantes. Este ADN repetitivo codificante forma múltiples copias de genes de gran valor adaptativo. Otro tipo de ADN repetitivo en tándem (satélite) es no codificante y sus secuencias se encuentran, en muchos casos, distribuidas por todo el genoma. Sin embargo, una parte importante del ADN repetitivo no forma agrupaciones en tándem y tiene su origen en la transposición de secuencias denominadas *elementos móviles* o *transponibles* que se encuentran dispersas por el genoma.

C. Mutación por reestructuración cromosómica

Se clasifican en dos tipos:

C.1. Mutación por reordenación cromosómica

Inversiones. Es cuando un segmento cromosómico invierte su orden. Cuando el segmento invertido incluye el centrómero se denomina *inversión pericéntrica*; por el contrario cuando no se incluye se denomina *inversión paracéntrica*.

Translocaciones. El intercambio de segmentos cromosómicos entre dos cromosomas no homólogos genera una *translocación*.

Tanto las inversiones como las translocaciones disminuyen la fertilidad, sin embargo, muchas especies presentan considerable polimorfismos a partir de estos mecanismos y otras muchas especies próximas se diferencian por ellos al encontrar mecanismos alternativos de evolución.

Deleciones y duplicaciones. Muchas reordenaciones cromosómicas, como las inversiones y las translocaciones, generan deleciones y duplicaciones. Las deleciones prácticamente no se encuentran en las poblaciones, puesto que son seleccionadas en contra. En cambio las duplicaciones facilitan la aparición de genes con funciones novedosas con valor adaptativo.

C.2. Mutación por multiplicación de cromosomas completos

La poliploidía. Es la multiplicación de todo el cariotipo. La importancia de la poliploidía en la evolución se refleja en el hecho de que del 70 al 80 % de las angiospermas tienen origen poliploide. La *Aneuploidía* se da cuando los cigotos tienen cromosomas de más o de menos en un determinado par, por lo general los individuos son inviábiles o menos vigorosos.

3.2.4. El equilibrio de Hardy-Weinberg

En 1908, el matemático inglés Godfrey H. Hardy y el físico alemán Wilhelm Weinberg idearon de forma independiente un sencillo modelo matemático que ahora se conoce como el principio de Hardy-Weinberg. Este modelo demuestra que, en ciertas condiciones, las frecuencias de alelos y las frecuencias de genotipos de una población permanecen constantes, independientemente del número de generaciones que transcurran. En otras palabras: no hay evolución en esta población (Curtis y Barnes, 2000). Los genetistas poblacionales dan a esta población idealizada sin evolución el nombre de población en equilibrio, la cual permanecerá en equilibrio genético, en tanto se cumplan varias condiciones:

1. No debe haber mutaciones.
2. No debe haber flujo de genes entre poblaciones: es decir, no debe haber migración neta de alelos hacia la población (por inmigración) o desde ella (por emigración).
3. La población debe ser muy grande.
4. Todo apareamiento debe ser aleatorio, sin que existan tendencias de ciertos genotipos a aparearse con otros genotipos específicos.
5. No debe haber selección natural: es decir, todos los genotipos deben ser igualmente adaptables y alcanzar el mismo éxito reproductivo.

En estas condiciones, las frecuencias de alelos de una población permanecerán sin cambio indefinidamente. En las poblaciones, generalmente las frecuencias de genotipos en la mayoría de los loci concuerdan muy bien con la distribución de Hardy-Weinberg (Futuyma, 1998). Esto no significa que los loci en equilibrios no estén sujetos a mutación, migración, selección, etc. sino que estos efectos son a menudo pequeños (Frankham et al., 2002). Si no se cumple una o más de estas condiciones, entonces las frecuencias de alelos pueden cambiar; en tal caso, habrá evolución (Curtis y Barnes, 2000).

La teoría de la genética poblacional predice que el equilibrio de Hardy-Weinberg puede ser alterado por desviaciones respecto a cualquiera de las cinco condiciones principales en las que se basa. Por tanto, podríamos predecir cinco causas principales del cambio evolutivo: (1) mutación, (2) flujo de genes, (3) deriva genética, (4) apareamiento no aleatorio y (5) selección natural. Esta última es la fuerza principal que explica el cambio en la frecuencia de los alelos (Audesirk et al., 2003 y Curtis y Barnes, 2000).

3.2.4.1. Las mutaciones

Una población permanecerá en equilibrio genético sólo si no hay mutaciones (cambios en la secuencia del ADN), pero las mutaciones son inevitables. Aunque las células cuentan con mecanismos eficientes que protegen la integridad de sus genes, incluso enzimas que constantemente examinan el ADN y reparan los defectos provocados por la radiación, los cambios químicos o los errores de copiado, algunos cambios en la secuencia de nucleótidos escapan a los sistemas de revisión y reparación. Cuando uno de estos cambios ocurre en una célula productora de gametos, es posible que la mutación se transmita a un descendiente y se introduzca en el acervo génico de la población (Audesirk et al., 2003).

Las mutaciones son poco frecuentes: ocurre una en cada 100,000 a 1,000,000 de genes por individuo en cada generación. Por lo que la mutación por sí misma no es una de las principales fuerzas de la evolución. Sin embargo, las mutaciones son la fuente de nuevos alelos, es decir, de nuevas variantes susceptibles de heredarse y que sirven de base a otros procesos evolutivos. Como tales, constituyen los cimientos del cambio evolutivo. Sin mutaciones no habría evolución y tampoco diversidad entre las formas de vida (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.4.2. El flujo de genes

Cuando los individuos pasan de una población a otra y se cruzan en la nueva localidad (inmigración y emigración de alelos), se transfieren alelos de una poza génica a otra (Audesirk et al., 2003). Este movimiento de alelos, o flujo de genes, entre poblaciones pueden introducir nuevos alelos o alterar las proporciones de los alelos ya presentes y, frecuentemente, este proceso tiene el efecto de contrarrestar a la selección natural. La interrupción de flujo génico por alguna barrera geográfica es un hecho muy importante en el proceso de formación de nuevas especies (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.4.3. Deriva genética

Audesirk et al. (2003) señalan que para que una población permanezca en equilibrio, debe ser lo suficientemente grande para que los sucesos fortuitos no influyan en su constitución genética general. Incluso al organismo más apto le puede sobrevenir un desastre. Si una población es suficientemente grande, es poco probable que sucesos aleatorios alteren la frecuencia general de los genes, porque es de esperar que los sucesos de este tipo influyan de igual manera en la reproducción de los organismos de todos los genotipos. En una población pequeña, sin embargo, es posible que sólo unos pocos organismos posean ciertos alelos y el azar podría reducir o incluso eliminar estos alelos en la población, con lo cual se alteraría su constitución genética (Audesirk et al., 2003).

Los mismos autores citan como ejemplo de cambio genético aleatorio en las poblaciones pequeñas a la **deriva genética**, mediante la cual es mucho más probable que los sucesos fortuitos cambien las frecuencias de alelos en una población pequeña que en una grande; porque:

1. La deriva genética tiende a reducir la variabilidad genética dentro de una población pequeña. En casos extremos, todos los miembros de una población

pueden llegar a ser genéticamente idénticos cuando por azar se fijan los mismos alelos en la población.

2. La deriva genética tiende a aumentar la variabilidad genética entre las poblaciones. Exclusivamente como resultado del azar, poblaciones separadas pueden llegar a tener por evolución frecuencias de alelos sumamente distintas.

Adicionalmente estos autores ilustran las enormes consecuencias de la reducción del tamaño de las poblaciones de una especie, con dos casos especiales de deriva genética:

A. Cuello de botella poblacional

En un **cuello de botella poblacional**, una población sufre una reducción drástica de tamaño; por ejemplo, a consecuencia de una catástrofe natural o por caza excesiva. En estas circunstancias, hay sólo unos pocos individuos disponibles para aportar genes a la población futura en su totalidad. Incluso si más adelante la población aumenta de tamaño significativamente, estos efectos genéticos del cuello de botella pueden perdurar durante cientos o miles de generaciones (Audesirk et al., 2003 y Curtis y Barnes, 2000).

Un ejemplo de cuello de botella, es lo ocurrido con la foca elefante nortea. Este animal fue cazado por su piel y aceite y sufrió un declive poblacional severo que incluso se llegó a pensar estaban extintos. Afortunadamente, una pequeña población de alrededor de 20-30 sobrevivió en la Isla Guadalupe en el Pacífico. Estudios alozímicos en 1974 demostraron que no tenían variabilidad genética en 20 loci alozímicos; mientras que la foca elefante sureña tenía niveles normales de diversidad genética. En 1993 se encontró que la foca elefante nortea tenía solo dos variantes de ADNmt comparado a 23 en las sureñas. Gracias a los esfuerzos de protección, estos animales se han recuperado a más de 100,000 y han sido removidos de la lista de especies en peligro (Frankham et al., 2002).

B. El efecto fundador

El **efecto fundador** es un tipo de deriva genética que ocurre como resultado de la fundación de una población por un pequeño número de individuos (Audesirk et al., 2003 y Curtis y Barnes, 2000).

El efecto fundador puede manifestarse cuando una nueva población es fundada a partir de una pequeña muestra de una población original (por ejemplo la colonización de una isla no habitada anteriormente, a partir de unos pocos individuos de una población continental), las frecuencias alélicas en el grupo fundador pueden ser diferentes de las presentes en la población de donde proceden. Como consecuencia de ello, el reservorio génico de la nueva población tendrá una composición diferente al reservorio de la población originaria (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.4.4. Apareamiento no aleatorio

El apareamiento no aleatorio o preferencial provoca cambios en las proporciones de los **genotipos** y puede o no afectar las frecuencias alélicas. Una forma de apareamiento no aleatorio, particularmente importante en las plantas, es la **autopolinización** (forma más extrema de endogamia). En los animales, el apareamiento no aleatorio depende, a menudo, del comportamiento. Este apareamiento no aleatorio es un componente importante de selección natural en algunas especies (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.4.5. Selección natural

Según Curtis y Barnes (2000), la **Selección Natural** es el proceso de interacción entre los organismos y su ambiente que resulta en una tasa de reproducción diferencial de los diferentes genotipos presentes en la población; puede dar como resultado, cambios en las frecuencias relativas de los alelos y

genotipos de la población, o sea, producir evolución. La selección natural puede operar solamente sobre las características expresadas en el fenotipo. La unidad de selección es el fenotipo completo: la totalidad del organismo. En casos extremos, un sólo alelo puede ser decisivo en la selección pero, generalmente, un fenotipo exitoso es el resultado de la interacción de muchos genes.

Además de la interacción entre genes, estos mismos autores indican que la selección natural implica además interacciones entre organismos individuales, su ambiente físico y su ambiente biológico (es decir, con otros organismos). Generalmente, el resultado de la selección natural es la adaptación (aunque imperfecta) de las poblaciones a su ambiente. La adaptación al ambiente biológico resulta de la interacción recíproca de especies de organismos (coevolución). La postura clásica que considera a la evolución como un proceso de creciente adaptación a partir de la acción de la selección natural ha recibido numerosas críticas.

3.2.5. Razones por las que se pierde la diversidad biológica y la variabilidad genética

Aún cuando las especies están adaptadas a sus condiciones locales, están expuestas a la extinción debido a estrés biótico o abiótico, causados por factores tales como competencia, predación, parasitismo y enfermedades o a alteración y aislamientos de sus hábitats debido a lentos cambios geológicos y climáticos, a catástrofes naturales o a actividades humanas. Disturbios masivos causados por los humanos han alterado, degradado, y destruido el paisaje natural a gran escala. Las mayores amenazas para la diversidad biológica que resulta de la actividad humana son: destrucción, fragmentación y degradación del hábitat (incluyendo contaminación), sobreexplotación de especies, introducción de especies exóticas, y extensión de enfermedades. La mayoría de estas especies se enfrentan simultáneamente al menos a dos o más de estas amenazas, acelerando su

camino a la extinción e impidiendo esfuerzos para protegerlas. Típicamente, estas amenazas se desarrollan tan rápidamente y en tal escala que las especies no son capaces de adaptarse genéticamente a los cambios o de dispersarse a una localización más hospitalaria (Primack, 1998; Ramanatha y Hodgking, 2002).

Las personas usan los recursos naturales, tales como combustible, carne silvestre y plantas silvestres; y convierte vastas cantidades de hábitat natural para propósitos residenciales y agrícolas. Debido a que hasta cierto punto el uso de los recursos es inevitable, el crecimiento poblacional es parcialmente responsable por la pérdida de la diversidad biológica. Sin embargo, el crecimiento poblacional no es la única causa de la extinción de las especies y la destrucción del hábitat: el sobre consumo de los recursos es también responsable (Primack, 1998).

La extinción de las especies y la destrucción de los ecosistemas no son necesariamente causadas por las necesidades básicas de los ciudadanos. El levantamiento del capitalismo industrial y sociedades modernas materialistas ha acelerado grandemente las demandas de los recursos naturales, particularmente en los países desarrollados. El uso ineficiente y derrochador y el sobre consumo de los recursos naturales son las mayores causas del declive en la diversidad biológica (Primack, 1998).

En Nicaragua, la causa principal ha sido el avance de la frontera agrícola y la ganadería; pero a través del tiempo nuevos problemas han surgido que han agudizado el problema y contribuido a la degradación y destrucción del recurso forestal, entre los que están: tenencia de la tierra, población en continuo crecimiento, sobreexplotación forestal; incendios forestales naturales y provocados por mal uso en prácticas agrícolas; y desastres naturales (por la posición geográfica Nicaragua es susceptible de ser azotada por huracanes y tormentas tropicales), el más reciente fue el huracán Mitch (FRA, 2000).

La fragmentación de hábitat reduce los tamaños de la población e incrementa el aislamiento de los fragmentos resultantes, los cuales completamente aislados sufren pérdida de la diversidad genética (endogamia), con reducción consecuente de su fitness (sobrevivencia y reproducción) y acumulación de mutaciones deletéreas. Todos estos factores incrementan el riesgo de extinción en comparación a poblaciones únicas (no fragmentadas) pero del mismo tamaño total. La **endogamia** es una consecuencia inevitable en poblaciones pequeñas. Eventualmente todos los individuos llegan a estar relacionados, de manera que los apareamientos entre parientes no se pueden evitar (Frankham et al., 2002).

3.2.6. Preservación y promoción de la variabilidad

Los árboles forestales juegan un papel crucial en ecosistemas terrestres, ofreciendo mayores beneficios ecológicos en términos de control climático, fijación de carbono, mantenimiento de la vida silvestre, conservación de agua y prevención de desertificación (Vaxevanidou et al., 2006). A pesar de ello, la creciente presión de las poblaciones humanas que aspiran a mejores niveles de vida, sin la debida consideración sobre la sostenibilidad del uso del recurso que sirve de base para tal desarrollo, es motivo de preocupación a este respecto. Aunque es inevitable que se produzcan en el futuro cambios en el uso del suelo, tales cambios deben programarse para ayudar a conseguir la complementariedad de los fines de conservación y desarrollo. Esto puede lograrse incluyendo los temas de conservación como componente importante en la programación del uso del suelo y las estrategias de conservación de los recursos (FAO, CSFD, IPGRI, 2002).

Sin embargo, a la fecha, muchos esfuerzos de conservación, tanto *in situ* como *ex situ* se ha hecho con poca información sobre la diversidad genética que estaba siendo conservada. Para superar esto, no sólo es necesario describir la variación observada, sino también identificar los principales factores que afectan la

estructura genética de las poblaciones de plantas, los que incluyen las condiciones climáticas, edáficas y bióticas, así como las específicas de las poblaciones (tamaño de la población, selección) o de las especies (ploidía, sistema de apareamiento, por ejemplo) (Ramanatha y Hodgking, 2002).

Frecuentemente, para preservar la variabilidad, los manejadores responsables de la conservación y recuperación de especies de plantas amenazadas, necesitan hacer elecciones en materia tales como, el área que necesita ser protegida, las poblaciones que deberían ser preservadas, el número mínimo de individuos requeridos para evitar problemas de endogamia y para sustentar la variación genética cuantitativa, o la forma en que el germoplasma debería ser colectado de una población para capturar la mayoría de la diversidad genética para conservación *ex situ* (Torres et al., 2003).

La importancia de la documentación sobre los niveles y distribución de la diversidad genética en especies, para designar estrategias de conservación óptimas, es muy reconocida por diferentes autores e instituciones internacionales. Por lo que desde 1992, el Programa de Medio Ambiente de las Naciones Unidas, (PNUMA), considera los recursos genéticos de las especies como prioridad en los programas de conservación de biodiversidad (González y Sosa, 2002) y la IUCN reconoce la necesidad de conservar la diversidad genética como una de las tres prioridades de la conservación (Frankham et al., 2002).

3.3. Marcadores moleculares

Hoy en día se poseen métodos moleculares cada vez más potentes para medir la variabilidad genética. Estas mediciones han puesto en evidencia una gran cantidad de variabilidad en los seres vivos que, aparentemente, da soporte a la idea de que existe suficiente variabilidad para que las poblaciones puedan continuar evolucionando. Sin embargo, todavía se sabe poco sobre cuánta de esta

variabilidad se expresa para constituir variantes fenotípicas de valor adaptativo (Fontdevila y Moya, 1999).

El análisis molecular de la variabilidad del ADN permite determinar puntos de referencia en los cromosomas, conocidos como "marcadores moleculares" (Tonon et al., 2002). Los **marcadores moleculares** son una serie de técnicas que permiten conocer la información genética que los organismos portan y funcionan como señaladores de diferentes regiones del genoma (Picca et al., 2004). Se puede considerar que cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso, sea un marcador (Azofeifa-Delgado, 2006).

Existen diferentes tipos de marcadores moleculares con diversos grados de complejidad, pero se pueden clasificar en dos tipos: marcadores bioquímicos y marcadores de ADN (Tonon et al., 2002).

3.3.1. Marcadores bioquímicos

Pueden provenir de la expresión de un gen, en cuyo caso se conocen como **isoenzimas**, denominados también "marcadores bioquímicos". El término isoenzima define un grupo de múltiples formas moleculares de una misma enzima que ocurre en una especie, como resultado de más de un gen codificando cada una de las enzimas (Tonon et al., 2002).

Las enzimas son proteínas consistentes de aminoácidos, algunos de los cuales están cargados eléctricamente. Como resultado, las enzimas tienen una carga eléctrica neta, dependiente de la cantidad de los aminoácidos que comprenden la proteína. Cuando una mutación en el ADN resulta en que un aminoácido ha sido reemplazado, la red de carga eléctrica de la proteína puede ser modificada, y la forma total (conformación) de la molécula también puede cambiar. Debido a que los cambios en la carga eléctrica y la conformación puede afectar la

velocidad de migración de las proteínas en un campo eléctrico, la variación isoenzimática puede ser detectada por electroforesis de gel y tinción subsiguiente de enzimas específicas que contiene sustrato para la enzima, cofactores y una sal oxidada (Spooner et al., 2005).

La principal debilidad de las isoenzimas es su abundancia relativamente baja y el nivel bajo de polimorfismo. Además, las proteínas con movilidad electroforética idéntica (comigración) podrían no ser homologas. Últimamente, las isoenzimas a menudo son consideradas marcadores moleculares dado que representan variantes de enzimas y las enzimas son moléculas. Sin embargo, las isoenzimas son de hecho marcadores fenotípicos, ya que pueden ser afectados por condiciones ambientales (Spooner et al., 2005).

3.3.2. Marcadores de ADN

Pueden provenir de un **fragmento específico de ADN** (correspondiente a regiones expresables o no del genoma) y detectan la variabilidad directamente a partir de la secuencia del ADN, basándose ya sea en el uso de enzimas de restricción o en la técnica de PCR. Los marcadores de ADN han sido aplicados en una amplia variedad de problemas centrales para el análisis del genoma de las plantas (Rafalski et al., 1996) (Tabla 2). Estos mismos autores consideran que cada sistema de marcador está caracterizado por una combinación única de ventajas y desventajas, la elección de un sistema de marcador está dictada por el alcance significativo de la aplicación. Factores a considerar en la elección de un sistema de marcador incluyen: la cantidad de material vegetal disponible (y consecuentemente la cantidad de ADN disponible), la calidad del ADN requerido, los recursos y técnicas disponibles, el costo por marcador, etc.

De forma general los marcadores de ADN se dividen en dos tipos: (1) los que se basan en el uso de enzimas de restricción y (2) los generados por PCR.

Tabla 2. Aplicaciones de los Marcadores de ADN.

Creación de mapas genéticos	Taxonomía molecular y evolución
Mapeo de rasgos simples	Identificación de individuos
Mapeo de loci de rasgo cuantitativo (QTLs)	Análisis Forense
Mapeo de mutaciones	Caracterización de germoplasma
Caracterización de transformantes	Identificación de germoplasma propietario
Diagnósticos genéticos para el cultivo de plantas	Análisis de muestras de herbario
Genética de poblaciones	Estimación de tamaño de genoma

Fuente: Rafalski et al., 1996

3.4. Marcadores de ADN basados en el uso de enzimas de restricción.

Aquí tenemos la técnica denominada *Polimorfismos de la Longitud de Fragmentos de Restricción* (RFLP – del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism). Los RFLPs son bandas que corresponden a fragmentos de ADN, usualmente en el rango de 2-10 Kb, que han resultado de la digestión de ADN genómico con enzimas de restricción (Spooner et al., 2005). Los fragmentos de ADN son separados por electroforesis en gel de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon o nitrocelulosa, este proceso es denominado Southern Blotting (Karp et al., 1997). Esta membrana es hibridizada con una sonda marcada con un isótopo radioactivo o con tintes alternativos no radioactivos, tales como digoxigenina o fluoresceína. Las sondas de RFLP específica de locus consisten de una secuencia homóloga de una región cromosomal específica (sondas homólogas). Las sondas son generadas a través de la construcción de bibliotecas de ADN genómico o bien de ADN complementario (ADNc) y además pueden estar compuestas de una secuencia específica de identidad desconocida (ADN genómico) o parte de la secuencia de un gen funcional (sólo exones, ADNc). Las sondas de RFLP son mantenidas como clones en vectores bacteriales apropiados que convenientemente permiten el aislamiento de los fragmentos de ADN que contienen. También pueden ser

usadas sondas de especies relacionadas – sondas heterólogas (Spooner et al., 2005; Becerra y Paredes, 2000).

Básicamente, los polimorfismos detectados por RFLPs son causados por rearrreglos del ADN, tales como deleciones, inserciones o sustituciones ya sea de secuencias o de nucleótidos únicos, lo que significa la ganancia o pérdida de sitios de restricción. Esto es detectado a través de diferencias en el peso molecular de los fragmentos homólogos de restricción del ADN genómico al hibridar con la sonda seleccionada (Becerra y Paredes, 2000).

Los RFLPs son conocidos generalmente por ser moderadamente polimórficos. En adición a su alta abundancia genómica y su distribución aleatoria, los RFLPs tienen ventajas de mostrar alelos codominantes (lo que permite diferenciar homocigotos de heterocigotos) y tener alta reproducibilidad, puesto que la misma combinación de enzimas y sonda puede dar los mismos resultados con las mismas muestras en diferentes laboratorios (Spooner et al., 2005; Karp et al., 1997). Por otro lado, las principales desventajas de los RFLPs son el requerimiento de procedimientos metodológicos técnicamente laboriosos y caros. Además, se requiere de grandes cantidades de ADN de alto peso molecular, purificado (1-10 µg) para cada digestión de ADN. Los RFLPs no son sensibles a la automatización y la colaboración entre equipos de investigación es importante para la distribución de sondas (Spooner et al., 2005). Al no ser automatizada esta técnica, es necesario invertir gran cantidad de tiempo para generarlos.

Los mismos autores afirman que los RFLPs pueden ser aplicados en estudios de diversidad y filogenia, desde individuos dentro de poblaciones o especies a especies estrechamente relacionadas. Los RFLPs han sido ampliamente usados para generar mapas de genes a causa de su alta abundancia y distribución aleatoria a través del genoma y a la abundante disponibilidad de diferentes enzimas de restricción. También han sido usados para investigar relaciones de taxa cercanamente relacionados, como herramientas de huella

genética, para estudios de diversidad y para estudios de hibridación e introgresión, incluyendo estudios de flujo génico entre poblaciones.

3.5. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La PCR (del inglés “Polimerase Chain Reaction”), es un método poderoso de síntesis de ADN *in vitro* desarrollado por Kary Mullis en la Corporación Cetus (Surzycki, 2002). Desde su introducción en 1985, la técnica ha revolucionado la biología molecular y es usada virtualmente en todas las áreas de las ciencias naturales y medicina (Surzycki, 2002 y Erlich et al., 1991).

La PCR es un método rápido y sencillo (automatizado) que utiliza una ADN polimerasa termoestables (obtenida de bacterias que habitan en aguas termales) para resistir las altas temperaturas a las que se somete la muestra. También se requiere de un par de cebadores (oligonucleótidos) que posean complementariedad de bases con los extremos del fragmento de ADN que se quiere amplificar. La reacción se lleva a cabo en un aparato llamado termociclador programado con el número de ciclos y temperaturas requeridas (Watson et al., 1991).

3.5.1. Descripción de la PCR

La amplificación *in vitro* de ADN se logra en tres pasos básicos, según lo descrito por Erlich et al. (1991):

Primer paso: **Desnaturalización**. Para que comience la reacción es necesario que el ADN molde se encuentre en forma de cadena sencilla (Watson et al., 1991). Esto se consigue aplicando temperaturas de 90 a 95°C por unos minutos, produciendo la ruptura de los puentes de hidrógeno intercadenarios y por lo tanto la separación de ambas cadenas.

Segundo paso: **Hibridación.** Esta fase se denomina también fase de “annealing” o de emparejamiento. Una vez que el ADN está desnaturalizado se disminuye la temperatura hasta un rango comprendido entre los 37 y los 65°C para que se pueda producir la unión de los cebadores por complementariedad de bases a las secuencias flanqueantes del fragmento que se va a amplificar.

Tercer paso: **Extensión.** Durante este paso la *Taq polimerasa* incorpora nucleótidos en el extremo 3' del cebador utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La temperatura a la que se lleva a cabo este paso suele ser de 72°C ya que es la temperatura a la que la *Taq polimerasa* alcanza su máxima actividad.

Ciclos repetitivos de desnaturalización del ADN molde, la hibridación de los cebadores y la extensión por la *Taq polimerasa* resulta en la amplificación del fragmento de ADN de interés. El producto de la extensión de cada cebador puede servir como molde para el otro cebador resultando en la duplicación de la cantidad del fragmento de ADN en cada ciclo. El resultado es un incremento exponencial en la cantidad del fragmento de ADN específico definido por los extremos 5' de los cebadores (Surzycki, 2002). La longitud de los productos generados durante la PCR es igual a la suma de las longitudes de los dos cebadores, más la longitud del ADN blanco entre los cebadores.

Actualmente existen diferentes tipos de PCR, entre ellos están:

PCR *in situ*: Se realiza en preparaciones fijas (secciones histológicas) sobre un portaobjeto. Luego de la amplificación se realiza la detección mediante hibridación *in situ* convencional. Permite la localización histológica de ADN y ARN blancos, de baja copia. Sin embargo, en muchas instancias podría ser útil para conocer el fenotipo específico de la célula que contiene el blanco o para desasegurar la distribución de una secuencia de ácido nucleico en la misma sección del tejido (Nuovo, 2001).

Gómez y Echenique (2004), reportan las siguientes técnicas:

RT-PCR. La reacción de PCR en unión con la **transcripción reversa (RT-PCR)** puede ser utilizada para el estudio de ARNm casi a nivel de una célula individual. Esta técnica puede utilizarse para determinar la **presencia o ausencia de un transcrito**, para estimar el **nivel de su expresión** y para el **clonado de ADNc** sin la necesidad de construir una genoteca. Consiste en la síntesis de una cadena de ADN a partir de ARNm por medio de la **transcriptasa reversa** (enzima extraída de virus tumorales cuyo material genético es ARN), que utiliza **ARN como molde para sintetizar una hebra de ADN**. La cadena complementaria se sintetiza por PCR. Subsecuentes ciclos de PCR nos permiten tener cantidades apropiadas del ADNc para diversas manipulaciones genéticas.

PCR cuantitativa. La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar el nivel de amplificación de una secuencia de interés, con el objeto de estimar la cantidad de esa secuencia en la muestra original. Para llevar a cabo esta detección existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de **otro fragmento de ADN (sonda) complementario** a una parte intermedia del ADN que se quiere amplificar. Esta sonda lleva adherida una **molécula fluorescente** y otra **molécula que inhibe esta fluorescencia** («quencher»), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la ADN polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del «quencher» y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. **La fluorescencia detectada durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.** En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una **curva patrón** en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando. Existen varios tipos de PCR cuantitativa. La más moderna y sofisticada es la llamada PCR en tiempo real.

PCR en tiempo real. La PCR en tiempo real es una técnica que ha ganado mucha importancia en los últimos años debido a que ofrece la posibilidad de

cuantificar el **número de copias de un transgen incorporadas en un genoma**. Se basa en la detección de un informador fluorescente cuya señal aumenta en proporción directa con la cantidad de producto de PCR en la reacción. Se emplea un termociclador que tiene acoplado un sistema de detección capaz de captar y cuantificar la señal emitida por el informador al final de cada ciclo. Se pueden utilizar diferentes reactivos fluorescentes como **agentes intercalantes** (SYBR green®) que se unen a la doble cadena de ADN dando un incremento de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad del producto de PCR. También se pueden emplear sondas que tienen unidas un **fotocromo informador** y un **fotocromo «quencher»** (TaqMan®). Cuando ambos fotocromos están unidos a la sonda, el informador no emite señal, pero cuando la sonda hibrida con la secuencia de interés, durante la reacción de PCR, la enzima *Taq* polimerasa, mediante su actividad de exonucleasa, **corta al fotocromo informador**, liberándolo del resto de la sonda y permitiendo la emisión de una señal fluorescente. Se monitorea esta señal que se va acumulando en los sucesivos ciclos de PCR. **De este modo, es posible estimar la cantidad de la secuencia original expresada en número de copias por genoma o en unidad de masa.**

3.5.2. Aplicaciones de la amplificación mediante PCR (Según Huertas, 2004 y Watson et al., 1991).

La PCR es una herramienta muy influyente en el rápido avance de los mapas y proyectos de secuenciación de genoma con lo cual ha revolucionado el mundo de la investigación genética ubicándose como pieza clave en diversa áreas de estudio. Al ser una técnica tan poderosa y versátil prácticamente está resultando imprescindible en todas aquellas disciplinas que tienen que ver con las ciencias de la vida, entre ellas biología molecular, biotecnología, genética evolutiva y de poblaciones, mejora de especies, salud pública, medicina, microbiología, botánica, zoología, medicina forense, antropología y geología, etc.

Así se emplea:

- a) En **biología molecular** para amplificar secuencias de ADN que luego son fácilmente clonadas y/o secuenciadas.
- b) En **biotecnología**, para la identificación rápida y temprana de animales y plantas transgénicas.
- c) En **genética general de poblaciones y evolutiva**, se emplea para cartografiar genes mediante estudio de ligamiento. Asimismo, para amplificar y detectar diferentes genotipos y estudiar su evolución dentro de las poblaciones.
- d) **En mejora de plantas y animales**. Cabe destacar las técnicas de RAPDs, AFLPs y microsatélites. Todas ellas generan, por diversos métodos, bandas de ADN que son resueltas mediante electroforesis en gel, dando origen a patrones determinados denominados huellas digitales, para distinguir especies variedades e incluso tipificación de individuos y se asocian a características importantes para el mejorador.
- e) En **espectrometría mutacional, toxicológica** y tratamiento del cáncer. Para amplificar y detectar mutaciones y translocaciones cromosómicas.
- f) En **medicina** para el tratamiento precoz de enfermedades infecciosas como el SIDA, o la posible existencia de enfermedades hereditarias en el embrión.
- g) En **microbiología, botánica y zoología** para la identificación de microorganismos, plantas y animales.
- h) En **medicina forense y legal** puesto que permite exonerar o inculpar posibles sospechosos y asignar o descartar presuntas paternidades.
- i) En **antropología y geología**, se ha amplificado ADN de restos humanos momificados del faraón Tutankhamon, así como ADN de hojas fósiles de magnolia procedentes del mioceno y de huesos fósiles del *Tyrannosaurus rex*.

3.6. Marcadores de ADN generados por PCR

De acuerdo a Tonon et al. (2002) entre los marcadores generados por PCR tenemos los siguientes tipos:

- ❖ En los que segmentos de ADN son amplificados arbitrariamente. Existen dos técnicas muy utilizadas, ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD – Random Amplified Polymorphic) y la Reacción en Cadena de la Polimerasa Arbitrariamente Cebada (AP-PCR, Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction).
- ❖ Polimorfismo de la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP, Amplified Fragment Length Polymorphism).
- ❖ Secuencias repetitivas que pueden ser secuencias simples repetidas o microsatélites (SSR-Simple Sequence Repeats) o también sitios de microsatélites marcados por secuencia (STMS-Sequence Tagged Microsatellites Sites, también pueden encontrarse citados como SSRP Simple Sequence Repeat Polymorphism).

3.7. RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar)

Este análisis fue descrito por primera vez en 1990 por Williams et al. (1990). Los marcadores RAPDs¹ son producidos por la PCR usando cebadores de oligonucleótidos cortos de secuencia escogida aleatoriamente. Los cebadores son típicamente de 10 pb de longitud y no se requiere el conocimiento específico de una secuencia particular de ADN para escoger o producir un cebador (Parker et al, 1998). Estos oligonucleótidos sirven como cebadores promotores (forward) e inversos (reverse) y son usualmente capaces de amplificar fragmentos de 1–10

¹ **RAPD** (en plural RAPDs), siglas en inglés de ADN Polimórfico Amplificado al Azar, se lee "rápid".

sitios genómicos simultáneamente. Los fragmentos amplificados, con tamaño usualmente dentro del rango de 0.5–5 kb (Spooner et al., 2005) y de hasta una distancia mínima entre cebadores de 200 pb (Tingey y del Tufo, 1993), son separados por electroforesis en gel de agarosa y los polimorfismos son detectados después por tinción en bromuro de etidio, como la presencia o ausencia de bandas de tamaños particulares (Spooner et al., 2005).

Más de 400 cebadores de 10 bases están comercialmente disponibles para identificar variación RAPD. Los cebadores son usados solos, no en combinación con un segundo cebador como sería el caso para la PCR estándar. Debido a esto, los fragmentos amplificados son regiones del genoma que están flanqueadas por el cebador (Parker et. al, 1998).

Los polimorfismos RAPDs pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del cebador (mutación puntual), lo cual impide que el cebador se una a la cadena, o también pueden ser el producto de cambios que alteren la distancia entre los cebadores impidiendo la exitosa amplificación del ADN molde (Azofeifa-Delgado, 2006). Se consideran bandas polimórficas las que están presentes en un individuo, pero ausentes en otro o tomando en cuenta el criterio de que un *locus* es polimórfico si la frecuencia del alelo más raro en el total de muestras analizadas es superior a 0.05 (Puertas, 1999), o igualmente si el alelo más común tiene una frecuencia que no supera el 0.95 (Fontdevila y Moya, 1999). Como regla general, los productos de amplificación representan un alelo por locus. En los estudios de herencia, los productos de la amplificación RAPD se comportan como marcadores dominantes (Waugh y Powell 1992).

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos: (1) ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar; (2) el cebador: que es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citosina para funcionar correctamente; (3) desoxirribonucleótidos: se requiere de

concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la nueva hebra; (4) solución tampón y (5). Taq-polimerasa: una enzima ADN polimerasa termoestable, que tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde, a partir de un punto determinado en este caso, por el cebador o iniciador, como también se le llama. (Phillips et al. 1995).

La principal ventaja de los RAPDs es que al realizarse por medio de la PCR, son rápidos y fáciles de ensayar, puesto que es automatizada. Debido a que la PCR está involucrada, solo se requieren bajas cantidades de ADN, usualmente 5–50 ng por reacción. Como se mencionó anteriormente, no es necesario conocer la secuencia complementaria de los cebadores. Los RAPDs tienen una abundancia genómica muy alta y están aleatoriamente distribuidos a través del genoma (Spooner et al., 2005). Otras ventajas son el costo relativamente bajo (\$ 2.00 por muestra por cebador usado). Normalmente, uno puede visualizar más de 40 muestras por gel de agarosa con un cebador; y con miles de combinaciones de cebadores, se puede rápidamente visualizar tantos loci como los que se requieran para cálculos con propósitos de diversidad o filogenia (Namkoong y Koshy, 2001).

En cuanto a las debilidades de la técnica, la principal es su carácter dominante. Cuando un locus muestra dominancia completa no hay manera de saber las frecuencias alélicas, puesto que no podemos distinguir los homocigotos dominantes de los heterocigotos por que tanto en unos como en otros aparece sólo una simple banda y el alelo nulo se distingue por que no aparece ninguna banda en el gel de electroforesis. En estos casos, se suele hacer la aproximación de estimar las frecuencias alélicas suponiendo que el locus está en equilibrio; entonces, la raíz cuadrada de los homocigotos recesivos sería la frecuencia q ; p se halla por diferencia: $p=(1-q)$ (Puertas, 1999).

Con respecto a sus aplicaciones, los RAPDs han sido usados para muchos propósitos, desde estudios a nivel individual (por ej. Identidad genética) a estudios

entre especies cercanamente relacionadas (Spooner et al., 2005). Esta tecnología también ha sido utilizada para catalogar frutos, seleccionar variedades, diferenciar líneas clonales y analizar variedades, por ejemplo apio, uva, limón y olivo (Huertas, 2004), también en análisis de paternidad, identificación de cepas y análisis filogenético (Parker et. al, 1998).

En *especies forestales* se reportan una gran cantidad de estudios de diversidad genética realizados con esta técnica, entre ellos los realizados en *Eucalyptus globulus* por Nesbitt et al. (1997), en *Quercus petrea* (De Greef et al., 1998), *Digitalis obscura* (Nebauer et al., 1999), en caoba (*Switenia macrophylla*) por Gillies et al. (1999). En especies de la familia Pinaceae hay muchos trabajos, por la importancia económica y ecológica de dichas plantas entre ellos tenemos estudios en *Pinus leucodermis* (Bucci et al., 1997), *Pinus oocarpa* de Nicaragua (Díaz et al., 2001).

En el Laboratorio de Genética Molecular de nuestra institución, se han realizado estudios con esta técnica en *Jatropha curcas* (Picado, 1997; Williams y Ramos, 2000) *Sabal mexicana* (Guido, 2005), *Pachira quinata* (Dolmus y García, 2006) y *Musa* sp. (Reyes y Ríos, 2006).

3.8. AFLP (Polimorfismo de la Longitud del Fragmento Amplificado)

AFLP es una técnica que fue propuesta por Vos et. al (1995) de KeyGene (Holanda), una empresa privada de biotecnología que adquirió los derechos de propiedad de esa tecnología (IPGRI y Cornell University, 2003a).

Estos autores, afirman que está técnica es una combinación de las tecnologías de RFLP y de PCR y está basada en la **amplificación selectiva** de los fragmentos de restricción mediante la PCR. Es un método muy sensible para

caracterizar el ADN cualquiera que sea su origen y su complejidad; se puede aplicar con ADN genómico total o con ADNc.

La técnica consiste en que el ADN objeto de estudio se digiere con dos enzimas de restricción diferentes, una de las cuales hace cortes frecuentes (su sitio de reconocimiento es de cuatro bases) y la otra hace cortes infrecuentes (su sitio de reconocimiento es de seis bases) (IPGRI y Cornell University, 2003a). Hecho esto, se ligan unos adaptadores sintéticos a los extremos de los fragmentos para proveer secuencias conocidas para la amplificación de PCR. Estos adaptadores son necesarios porque la secuencia del sitio de restricción en el extremo de los fragmentos es insuficiente para el diseño del cebador. Tanto la etapa de restricción como la etapa de ligación se pueden realizar en una sola reacción. Las extensiones cortas de secuencia conocida son agregadas a los extremos del fragmento a través del uso de una enzima ligasa (Karp et al., 1997).

A continuación se sigue describiendo la técnica en base a lo reportado por IPGRI y Cornell University (2003a):

Luego de las etapas de restricción y ligación, se realiza una primera PCR (preselectiva), usando cebadores oligonucleótidos complementarios al adaptador y a los sitios de restricción. Se añade un nucleótido a los cebadores para seleccionar sólo un subconjunto de fragmentos. Estos productos se someten a otra PCR y nuevamente se selecciona un subconjunto de fragmentos. Generalmente, en la segunda amplificación selectiva se agregan dos nucleótidos más a los cebadores. El subconjunto de fragmentos obtenidos se analiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes para generar una huella identificadora. Las bandas de ADN pueden detectarse empleando diversos procedimientos. Si se usan cebadores fluorescentes, éstos tienen la ventaja de que se pueden cargar en conjuntos de tres en el mismo carril del gel, cada uno marcado con diferente color, de modo que se maximiza el

número de datos recogidos por gel. Una segunda ventaja de estos cebadores, al igual que la detección con nitrato de plata, es la de evitar el uso de radioisótopos.

La base molecular de los polimorfismos de AFLP generalmente se origina en los nucleótidos. Se detectan cambios de un solo nucleótido cuando: (1) se afectan los propios sitios de restricción; y (2) se afectan los nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción, lo que hará que los cebadores hibriden erróneamente en el extremo 3' impidiendo la amplificación.

La tecnología de AFLP puede aplicarse a cualquier muestra de ADN. Debido a la naturaleza de los cebadores de AFLP, y a las temperaturas de hibridación los marcadores obtenidos son sumamente confiables y sólidos, y no son afectados por las pequeñas variaciones del proceso de amplificación. Las desventajas de los AFLPs es que: generan cantidades enormes de información, por lo que pueden requerir un análisis automatizado y, por consiguiente, tecnología de computación adecuada; son de tipo dominante; en los mapas genéticos, los AFLP se agrupan, con frecuencia, en los centrómeros y telómeros; y requieren bastante técnica en el laboratorio y, especialmente, en el análisis de los datos actualmente, luego de la doble amplificación por PCR se detectan automáticamente en un secuenciador.

Entre sus aplicaciones más comunes tenemos: evaluación de diversidad genética, análisis de distancia genética, huella identificadora de ADN, análisis de colecciones de germoplasma, construcción de mapas genéticos y seguimiento de marcadores de diagnóstico.

3.9. Microsatélites

Los marcadores microsatélites son segmentos cortos de ADN de 1 a 10 pb, los más típicos miden de 2 a 3 pb, los cuales se repiten en tándem y de forma aleatoria en el genoma no codificante de los seres vivos (Aranguren-Méndez y

Jordana, 2001 y IPGRI y Conell University, 2003b). Este tipo de ADN repetitivo es común en organismos eucariotas, y el número de unidades repetidas varía ampliamente entre los organismos, hallándose en algunos hasta 50 copias de la unidad repetida (IPGRI y Conell University, 2003b). Si las secuencias nucleotídicas en las regiones flanqueadas del microsatélite son conocidas, pueden ser diseñados cebadores específicos (generalmente 20-25 pb) para amplificar el microsatélite por PCR (Spooner et al., 2005).

Una de las ventajas de estos marcadores *versus* otros como los minisatélites, RFLP, RAPD, etc. radica en que están considerados, por la mayoría de autores como la más poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones, ya que: son muy polimórficos, presentan herencia mendeliana simple, son codominantes (pudiéndose diferenciar los individuos homocigotos de los heterocigotos), son fáciles de medir y analizar, y son cien por ciento fiables, reproducibles y automatizables (Aranguren-Méndez y Jordana, 2001).

A partir de la demostración de la existencia de variabilidad genética en estas regiones y la posibilidad de su detección mediante amplificación por PCR, los microsatélites se han convertido en la principal fuente de marcadores genéticos. Debido a ello, están adquiriendo una importancia creciente en los últimos años en estudios sobre análisis de variabilidad genética y relaciones entre especies y razas, así como para controles de paternidad o identificación de muestras (Morera et al., 1999). Del mismo modo que con los RAPD, el uso de la PCR genera datos rápidamente y requiere poco ADN. Todos los métodos de microsatélites usan los mismos protocolos básicos que usan los RAPD (extracción de ADN y PCR) y requieren el mismo equipo (IPGRI y Conell University, 2003b).

En cuanto a la desventaja, la forma de detección y las diferentes nominaciones que la técnica tiene es que requiere de algún conocimiento preexistente de la secuencia del ADN de la región, aunque sólo sea parcial. Su inconveniente principal es la inversión en esfuerzo y costo que se necesita para

diseñar los cebadores específicos de cada locus lo que se solventa de alguna manera por medio de la colaboración entre investigadores de diferentes laboratorios.

La variación en tamaño de los productos de la PCR se debe a la diferencias en el número de las unidades repetidas en el microsatélite. Los polimorfismos de SSR se pueden visualizar mediante electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. Los alelos del microsatélite se detectan usando diversos métodos: tinción con bromuro de etidio, nitrato de plata, radioisótopos o fluorescencia. Si se usan cebadores marcados con fluorescencia, y los productos son suficientemente diferentes en tamaño y no se sobreponen, se puede cargar un carril con varios productos de reacción de forma simultánea, lo que aumenta enormemente la eficiencia de estos marcadores. También la detección se puede realizar automáticamente por medio de un secuenciador.

Los microsatélites también se llaman repeticiones de secuencia simple (SSR) y, ocasionalmente, sitios de microsatélite de secuencia etiquetada (STMS) o polimorfismo de repeticiones de secuencia simple (SSRP) (IPGRI y Cornell University, 2003b).



IV

*Materiales y
Métodos*

4.1. Material vegetal

Para este estudio se analizaron un total de 101 individuos de *Pinus tecunumanii* correspondientes a 5 poblaciones del Norte de Nicaragua: en Matagalpa, Yúcul, cerca de San Ramón; Apante, en el cerro del mismo nombre y Monte Carmelo, en La Rinconada de Güisisil. En Jinotega, La Brellera, cerca de San Rafael del Norte. En Estelí, San Nicolás cerca del pueblo del mismo nombre. Véase la Tabla 3 y la Figura 5 para detalles de los puntos de recolección de muestras utilizando (mapa generado por ArcView GIS 3.0 con los archivos (*.shp) generados por MARENA).

La recolección de las muestras se realizó entre Marzo y Abril del 2005 teniendo en cuenta la distribución geográfica de esta especie a lo largo del país, basado en estudios realizados por el CMG & BSF (1994). Aunque se hicieron expediciones al Departamento de Nueva Segovia, para obtener muestras de Las Camelias (una de las mejores procedencias de *P. tecunumanii* según ensayos internacionales), no se encontraron árboles con conos. Nueva Segovia es el Departamento más afectado por *Dendroctonus frontalis* y quizás eso podría haber afectado la producción de semillas.

Con la ayuda de una tijera telescópica, se cortaron los conos maduros cerrados o entreabiertos de los árboles muestreados, los cuales fueron debidamente etiquetados. La distancia entre árboles muestreados fue de 100 m. El número medio de árboles muestreados fue de 20.2 por procedencia (rango 18-24) y la distancia mínima entre procedencias fue de 15 Km. Luego las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León.

Para abrir los conos y obtener las semillas, se sometieron a una temperatura de 50°C durante 5-12 h y se conservaron a 4°C. Para extraer el megagametofito, los cuales fueron almacenados a -20 °C para proceder a la extracción de ADN total, se despojaron de sus testas con la ayuda de una pinza y un bisturí.

Tabla 3. Poblaciones de *P. tecunumanii* de Nicaragua muestreadas

	Departamento	Coordenadas UTM		Altitud	LBR	MCA	SNI	YUC
		E	N					
APA	Matagalpa	617543.8332	1424498.33	986	44	41	50	15
LBR	Jinotega	593907.31	1461275.631	1242	–	66	42	52
MCA	Matagalpa	586884.7285	1396736.8	908		–	39	54
SNI	Estelí	566893.8274	1429860.455	1048			–	66
YUC	Matagalpa	632003.8951	1426406.579	901				–

Apante (APA), La Brellera (LBR), Monte Carmelo (MCA), San Nicolás (SNI), Yúcul (YUC); coordenadas UTM; altitud (en msnm) y distancias entre poblaciones (en Km)

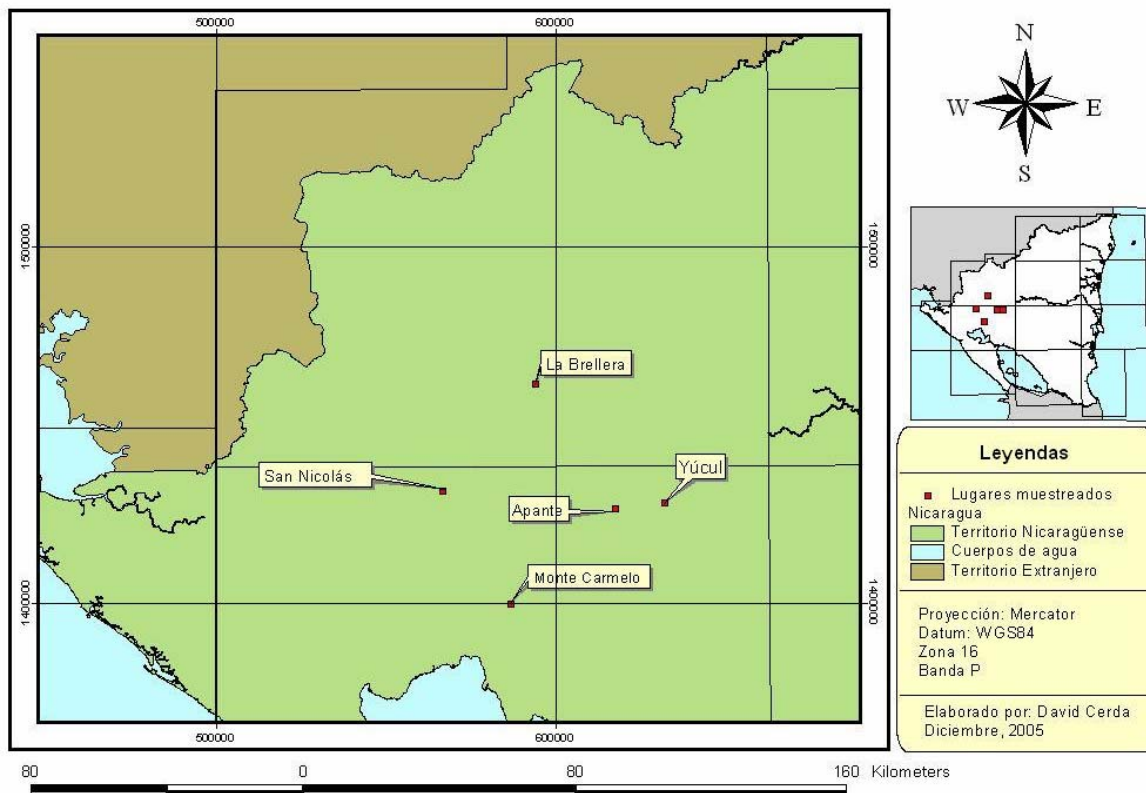


Figura 5. Poblaciones muestreadas de *Pinus tecunumanii* de Nicaragua.

4.2. Métodos

4.2.1. Extracción de ADN Total

Aunque en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León (UNAN-León) se extrajo con éxito el ADN de megagametofitos individuales de los 101 individuos analizados, siguiendo el protocolo para tejido fresco de Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones; para la amplificación se utilizó ADN extraído con las mismas muestras de las poblaciones de Pinos, casi paralelamente en el Laboratorio del Departamento de Biología Celular y Genética de la Universidad de Alcalá de Henares (UAH), obtenido con el mismo protocolo y con el cual se aplicó la técnica AFLP en ese laboratorio.

El procedimiento utilizado consistió en macerar los megagametofitos (3-8) en nitrógeno líquido en un tubo Falcon de 12 ml. Una vez pulverizado el tejido se le agregó 2 ml de tampón de extracción precalentado a 60°C [2% CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA·Na₂·2H₂O, 1.4 M NaCl₂], al momento de la extracción le adicionó 0.2% de 2-β mercaptoetanol y 5 µl de proteinasa K (20 mg/ml). Seguidamente se incubó a 60°C por 30min agitando ocasionalmente. Para separar los ácidos nucleicos de los restos celulares se hicieron dos extracciones con 1 volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y para precipitar los ácidos nucleicos se adicionó isopropanol al 100% (2/3 volúmenes del sobrenadante), conservándolo a – 20°C por 2 h. Posteriormente se centrifugó en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y el pellet restante se lavó dos veces en 1 ml de tampón de lavado (etanol al 76% y acetato de amonio a 10mM) por 20min. Se centrifugó de nuevo en las condiciones anteriores y el pellet se secó a temperatura ambiente aproximadamente 15 min. A continuación se resuspendieron los ácidos nucleicos

en 500 µl de tampón TE [10mM Tris-HCl (pH 7.4) y 1 mM EDTA·Na₂·2H₂O] y para eliminar el ARN se trató con 5µl de ARNasa (10µg/ml) incubándose a 37°C por 30min. Posteriormente el ADN se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le adicionó acetato de amonio a una concentración final de 2.5 M y 1 volumen de etanol puro frío para precipitar el ADN. Se centrifuga en las mismas condiciones y se secó el ADN a temperatura ambiente unos 30 min hasta que se evapore totalmente el alcohol. El ADN se resuspendió en 100 µl de tampón TE para conservarlo a – 20°C.

La calidad del ADN se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa [0.8% de agarosa fundida en TAE 1X (Tris-acetato 0.04 M y EDTA 0.001 M)] a un voltaje de 5 V/cm. 5 µl de una muestra de ADN con 1 µl de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol y 30% de glicerol) se colocaron en los pozos del gel. Luego se sumergió el gel en una cubeta con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 µg/ml por 15 min para visualizarse y fotografiarse bajo luz UV usando un sistema de documentación de geles (Gel Doc, BIO-RAD).

El ADN extraído luego fue purificado con el High Pure PCR Product Purification Kit de Roche Applied Science. La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, el cual cuantifica directamente la concentración de ADN que hay en 1 µl. Todo esto se realizó en la UAH.

4.2.2. Amplificaciones del ADN por la técnica RAPD

Para obtener los marcadores RAPDs se utilizó el procedimiento descrito por Williams et al. (1990) con pequeñas modificaciones.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl y la mezcla consistió de 25 ng de ADN, en tampón A 1X (Fisher Scientific) [10mM Tris-

HCl (pH 9.0 a temperatura ambiente), 50 mM KCl y 1.5 mM MgCl₂], 200 μM de dNTPs, 1.5 μl de MgCl₂ adicional (1.5mM, concentración final), 0.2 μM del cebador y 1U de Taq polimerasa (Fisher Scientific). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador AmpliTron® II Thermolyne programado con una desnaturalización inicial de 3 min a 92°C, seguido de 45 ciclos que comprenden: una desnaturalización de 30 seg a 92°C, hibridación de 2 min a 37°C y una elongación de 1 min a 72°C. También contenía una extensión final de 8 min a 72°C. Al finalizar la amplificación, se añadieron 5 μl de tampón de carga a los 25 μl de mezcla de reacción. Luego el total de la muestra se depositó en un gel de agarosa al 2.0% sumergido en tampón TAE 1X (Maniatis et al., 1982). Se depositó también en el gel 10 μl de marcador de peso molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker Sigma) con bandas de 50 a 10,000 pb, 5 veces concentrado. Después de la migración por electroforesis a un voltaje de 200 V por 2 h, se tiñó el gel colocándolo 45 min en una cubeta con una solución de bromuro de etidio a 0.5 μg/ml. Finalmente los fragmentos amplificados fueron visualizados y fotografiados sobre una lámpara UV.

Para elegir los cebadores a utilizar en todas las muestras se ensayaron 50 decanucleótidos de secuencia arbitraria; 47 de Operon Technologies, Inc. (OP), USA y 3 de University of British Columbia, Vancouver, Canadá (UBC) (Véase la designación y secuencia de los cebadores ensayados en Tabla 4), usando tres individuos aleatoriamente escogidos de los 101 existentes.

4.3. Análisis de Datos

4.3.1. Frecuencia de Bandas y Frecuencias Alélicas

Con el patrón de bandas obtenidos por la separación durante la electroforesis de los diferentes fragmentos amplificados, se construyó una matriz presencia-ausencia, en la cual el “1” indica la presencia de banda, “0” la ausencia

y “2” datos perdidos. Se analizó esta matriz para averiguar si existían bandas que estaban simultáneamente presentes o simultáneamente ausentes en los mismos individuos, utilizando una prueba de correlación incluida en el programa SIMINT del paquete informático NTSYS 2.20 (Rohlf, 2005).

Tabla 4. Designación y secuencia de los 50 cebadores ensayados en tres muestras de ADN de *Pinus tecunumanii* con la técnica RAPD.

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Cebadores	Secuencia 5' → 3'
OPA-04	AAT CGG GCT G	OPM-13	GGT GGT CAA G
OPB-05	TGC GCC CTT C	OPN-09	TGC CGG CTT G
OPB-10	CTG CTG GGA C	OPN-12	GGG ACG TTG G
OPC-07	GTC CCG ACG A	OPP-08	ACA TCG CCC A
OPC-18	TGA GTG GGT G	OPQ-02	TCT GTC GGT C
OPD-07	TTG GCA CGG G	OPR-02	CAC AGC TGC C
OPE-12	TTA TCG CCC C	OPR-06	GTC TAC GGC A
OPE-14	TGC GGC TGA G	OPR-07	ACT GGC CTG A
OPE-18	GGA CTG CAG A	OPS-02	CTA CTG CGC T
OPE-19	GTC AGG GCA A	OPS-07	TCC GAT GCT G
OPF-01	ACG GAT CCT G	OPS-08	TTC AGG GTC G
OPG-05	CTG AGA CGG A	OPS-18	CTG GCG AAC T
OPG-10	AGG GCC GTC T	OPT-04	CAC AGA GGG A
OPH-07	CTG CAT CGT G	OPT-08	AAC GGC GAC A
OPH-18	GAA TCG GCC A	OPT-12	GGG TGT CAA G
OPI-06	AAG GCG GCA G	OPU-05	TTG GCG GCC T
OPJ-02	CCC GTT GGG A	OPU-16	CTG CGC TGG A
OPK-08	GAA CAC TGG G	OPW-14	CTG CTG AGC A
OPK-09	CCC TAC CGA C	OPY-14	GGT CGA TCT G
OPK-12	TGG CCC TCA C	OPAD-10	AAG AGG CCA G
OPK-13	GGT TGT ACC C	OPAE-16	TCC GTG CTG A
OPK-18	CCT AGT CGA G	OPAG-14	CTC TCG GCG A
OPM-04	GGC GGT TGT C	UBC-223	GAT CCA TTG C
OPM-05	GGG AAC GTG T	UBC-228	GCT GGG CCG A
OPM-06	CTG GGC AAC T	UBC-411	GAG GCC CGT T

Cada banda fue considerada como un locus con dos alelos, el alelo dominante sería el amplificable mientras que el recesivo sería el alelo nulo no amplificable.

Las frecuencias alélicas se estimaron a través del programa informático TFGA 1.3 (Miller, 1997). Para este programa, comparado con el NTSYS en la matriz de presencia-ausencia, se usa el número "1" para marcar presencia de una banda, "2" para marcar la ausencia en lugar del "0" y el "0" se usa para marcar datos perdidos. También se diferencian los datos por población numerándolas debidamente.

4.3.2. Diversidad Genética

Para estimar la diversidad genética se utilizaron exclusivamente los marcadores que resultaron polimórficos en el conjunto de la muestra analizada. La diversidad intrapoblacional se determinó **a nivel fenotípico** (diversidad fenotípica) considerando las **frecuencias fenotípicas**: frecuencia de presencia de banda y frecuencia de ausencia de banda, y **a nivel génico** (diversidad génica) considerando las **frecuencias alélicas**: frecuencia del alelo dominante y frecuencia del alelo nulo.

La diversidad fenotípica para cada marcador en cada población se calculó utilizando el estadístico no sesgado de Nei (1987), definido para bajo número de individuos como:

$$h_i = \frac{n(1 - \sum_i p_i^2)}{n - 1} \quad \text{[ecuación 1]}$$

Donde n es el número de individuos analizados en la población y p_i es la frecuencia del fenotipo i .

Con el objeto de que se pudieran establecer comparaciones entre los niveles de diversidad detectados por cada cebador, se calcularon los valores de diversidad para cada cebador en cada población, como:

$$H_j = \frac{\sum_r h_i}{r} \quad [\text{ecuación 2}]$$

Donde h_i es la diversidad del marcador i detectado por un determinado cebador y r es el número de marcadores revelados por ese cebador.

Para cada población el valor de diversidad fenotípica (H_f) se calculó como la media de los valores H_j para el total de cebadores utilizados.

Todas las estimaciones se realizaron utilizando el programa informático Arlequín 3.01 (Excoffier et al., 2005). Aquí se utilizaron matrices de presencia-ausencia de 1s y 0s. Se hicieron tantas matrices como cebadores con los datos agrupados por población.

La diversidad génica (frecuencias alélicas) para cada locus en cada población se estimó utilizando el mismo estadístico no sesgado de Nei (1978):

$$h_i = \frac{2n(1 - \sum_i p_i^2)}{2n - 1} \quad [\text{ecuación 3}]$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i en la población analizada y n es el número de individuos analizados de dicha población. La diversidad génica en la población (H_g) se calculó promediando los valores h_i obtenidos para todos los loci analizados. Estas estimaciones se realizaron utilizando el programa informático TFGA 1.3 (Miller, 1997).

Las distribuciones de diversidades medias poblacionales obtenidas tanto por el método, fenotípico y génico, se compararon estadísticamente utilizando el

test de la *t* para muestras apareadas del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus ver 5.1.

4.3.3. Diferenciación entre poblaciones

La diferenciación acumulada a lo largo del tiempo por las poblaciones estudiadas será estimada utilizando tanto diversidades como distancias genéticas entre las poblaciones. Con las distancias genéticas se realizó también un análisis de la varianza molecular.

A. Estimación en términos de la diversidad fenotípica

Estos análisis se realizaron basándose en lo descrito por Nei (1987). En el **análisis fenotípico** para cada cebador utilizado se calculó:

a. La diversidad intrapoblacional media:

$$H_{POP} = \frac{1}{n} \sum_n H_j \quad \text{[ecuación 4]}$$

Donde *n* es el número de poblaciones.

b. La diversidad total H_T , estimada como indica en el apartado 4.3.2 ecuación [1] pero a partir de las frecuencias de cada fenotipo en el conjunto de la muestra analizada. Es decir, se hicieron tantas matrices como cebadores, pero los datos se introdujeron de tal forma como si fuesen de una única población.

c. El componente de diversidad intrapoblacional.

$$\frac{H_{POP}}{H_T} \quad \text{[ecuación 5]}$$

d. El componente de diversidad interpoblacional o coeficiente de diferenciación entre poblaciones:

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_{POP}}{H_T} \quad \text{[ecuación 6]}$$

El valor G_{ST} total se obtuvo como promedio del total de cebadores utilizados.

B. Estimación en términos de distancias genéticas. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

La información proporcionada por los marcadores RAPDs se utilizó siguiendo el procedimiento desarrollado por Excoffier et al. (1992) y aplicado a fenotipos según Huff et al. (1993).

Se analizaron fenotipos globales teniendo en cuenta todos los marcadores detectados. Los fenotipos fueron comparados dos a dos para determinar una medida de la distancia entre ellos. La distancia empleada fue calculada como el número de bandas no compartidas por los dos fenotipos comparados que es equivalente a una distancia euclidiana al cuadrado (δ_{ij}^2). De esta manera se construyó una matriz de distancias entre todos los fenotipos analizados. La idea central de la AMOVA es utilizar la matriz de distancias para realizar un análisis de varianza para los fenotipos obtenidos donde se extraen sus dos componentes: varianza entre individuos pertenecientes a una misma población y varianza entre individuos entre poblaciones. Véase el diseño del análisis en la Tabla 5.

Tabla 5. Diseño del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para este estudio.

Fuente de variación	Grados de libertad	Media de desviaciones al cuadrado	Media de desviaciones al cuadrado esperadas
Entre poblaciones	P-1	MSD(AP)	$n\sigma_a^2 + \sigma_b^2$
Dentro de poblaciones	N-P	MSD(WP)	Σ_b^2
Total	N-1	MSD(T)	σ_T^2

Donde: P es el número de poblaciones

N es el número de individuos

MSD(AP)= media de las desviaciones al cuadrado entre poblaciones.

MSD(WP)= media de las desviaciones al cuadrado dentro de poblaciones.

MSD(T)= media total de las desviaciones al cuadrado.

n= tamaño muestral medio y está dado por la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N - \sum_p \frac{N_p^2}{N}}{P - 1} \quad \text{[ecuación 7]}$$

Cada media de desviaciones al cuadrado es obtenida de la suma de desviaciones al cuadrado (SSD) entre el grado de libertad. En cada caso, el valor de SSD se expresa como una función de las distancias fenotípicas entre los individuos que se estén analizando. Por ejemplo:

$$SSD_{(T)} = \frac{1}{4} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2 \quad \text{[ecuación 8]}$$

Donde δ_{jk} es la distancia calculada entre los individuos j y k de la muestra total.

Este análisis permite calcular el estadístico Φ análogo al F de Wright, con siguiente ecuación:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2} \quad \text{[ecuación 9]}$$

Φ_{ST} determina la correlación entre pares de fenotipos tomados al azar de una misma población con respecto a la de pares de fenotipos tomados al azar del total de la muestra estudiada. Cuanto mayor sea el grado de parentesco en cada una de las poblaciones individuales, mayor será la diferenciación entre las distintas poblaciones. Mide el grado de diferenciación entre todas las poblaciones estudiadas.

Los niveles de significancia de los componentes de la varianza y los estadísticos Φ fueron obtenidos mediante un análisis permutacional no paramétrico utilizando 1000 repeticiones.

Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa informático Arlenquín 3.01 (Excoffier et al., 2005).

4.3.4. Relaciones Filogenéticas

El programa Arlenquín 3.01 se utilizó para obtener el valor Φ_{ST} entre cada par de poblaciones (**frecuencias fenotípicas**). La matriz de valores Φ_{ST} fue convertida en una matriz de distancias genéticas análogamente a lo propuesto por **Reynolds et al.** (1983) para valores F_{ST} :

$$D = -\ln(1 - \Phi_{ST}) \quad [\text{ecuación 10}]$$

Esta distancia es una medida apropiada para estimar la divergencia entre poblaciones debida exclusivamente a la deriva genética.

Los valores de distancia genética fueron utilizados para construir un dendrograma empleando el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) con el programa NEIGHBOR del paquete informático PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 2004). Luego para mejor presentación se graficó el dendrograma con el programa informático TreeView 1.6.6 (Page, 1996).

Para probar la bondad de ajuste del dendrograma resultante con la matriz de valores de distancias genéticas, se construyó el mismo dendrograma con el programa NJOIN del software NTSYS 2.20 (Rohlf, 2005), introduciendo la matriz de coascendencia de Reynolds et al. (1983) en formato NTSYS, luego se extrajo del dendrograma la matriz cofenética con el comando COPH del mismo software y esta fue comparada con la matriz original de valores de distancias genéticas (Sneath y Sokal, 1973). La comparación se realizó mediante una prueba de

correlación producto-momento, y el nivel de significancia se determinó mediante el análisis permutacional de Mantel (1967) con 1000 permutaciones, utilizando el programa MAXCOMP incluido en NTSYS 2.20 (Rohlf, 2005). Así mismo, con este programa se determinó si existía correlación positiva entre distancias genéticas (matriz de distancias de coascendencia) y distancias geográficas entre poblaciones individuales.

Las **distancias genéticas entre poblaciones se calcularon** también a partir de las **frecuencias alélicas** utilizando el cálculo de distancias genéticas no sesgadas (Nei, 1978) que viene corregida para bajo número de individuos:

$$D = -\ln I \quad [\text{ecuación 11}]$$

$$\text{Donde: } I = \frac{(2n - 1) \sum_r \sum_i p_{rix} p_{riy}}{\left[\sum_r (2n \sum_i p_{rix}^2 - 1) \sum_r (2n \sum_i p_{riy}^2 - 1) \right]^{1/2}} \quad [\text{ecuación 12}]$$

Siendo p_{rix} y p_{riy} las frecuencias del alelo A_i en el locus r en las poblaciones X e Y , respectivamente.

Este parámetro estima el número de sustituciones alélicas por locus que han ocurrido en la evolución independiente de dos poblaciones distintas bajo condiciones de equilibrio deriva-mutación.

De los valores de distancia genéticas se construyeron dendrogramas utilizando el método neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). Para probar la consistencia de las relaciones entre poblaciones obtenidas en los dendrogramas se utilizó un proceso de bootstrap sobre los loci. Este proceso realizó un remuestreo al azar de los datos de frecuencias génicas en el que se generaron 1000 replicas del juego de datos inicial. En cada una de esas réplicas se mantiene el número de loci de cada población pero algunos loci podían estar representados

más de una vez y otros no estar representados. De cada réplica se generó una matriz de distancias y el correspondiente dendrograma. Del conjunto de dendrogramas se obtuvo uno de consenso en el que se indica el número de réplicas que apoyan cada rama. Las matrices de distancia genética y sus réplicas se generaron utilizando el programa informático RAPDDIST ver. 1.0 (Black, 1998). Los dendrogramas y el dendrograma consenso se hicieron usando los programas NEIGHBOR y CONDENSE del paquete informático PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 2004). Luego se usó el programa TreeView 1.6.6 (Page, 1996), para graficar el dendrograma.



V

*Resultados y
Discusión*

5.1. Extracción de ADN

Además de tener el Laboratorio de Biología Celular y Genética de la UAH, mejores condiciones y equipos más nuevos, se prefirió utilizar este ADN para el presente estudio, como ya se mencionó anteriormente, debido a las siguientes consideraciones: (1) se extrajo de varios megagametofitos por individuo (pool de genes), por lo que se obtenía más información genética; (2) el ADN era de mejor calidad, por el uso de nitrógeno líquido en la extracción de ADN, de un kit comercial para la purificación del ADN; y (3) permitiría posteriormente llevar a cabo una mejor comparación de los resultados obtenidos con la técnica AFLP que se realizó en dicho laboratorio (Véase Figura 6 para foto de ADN extraído).

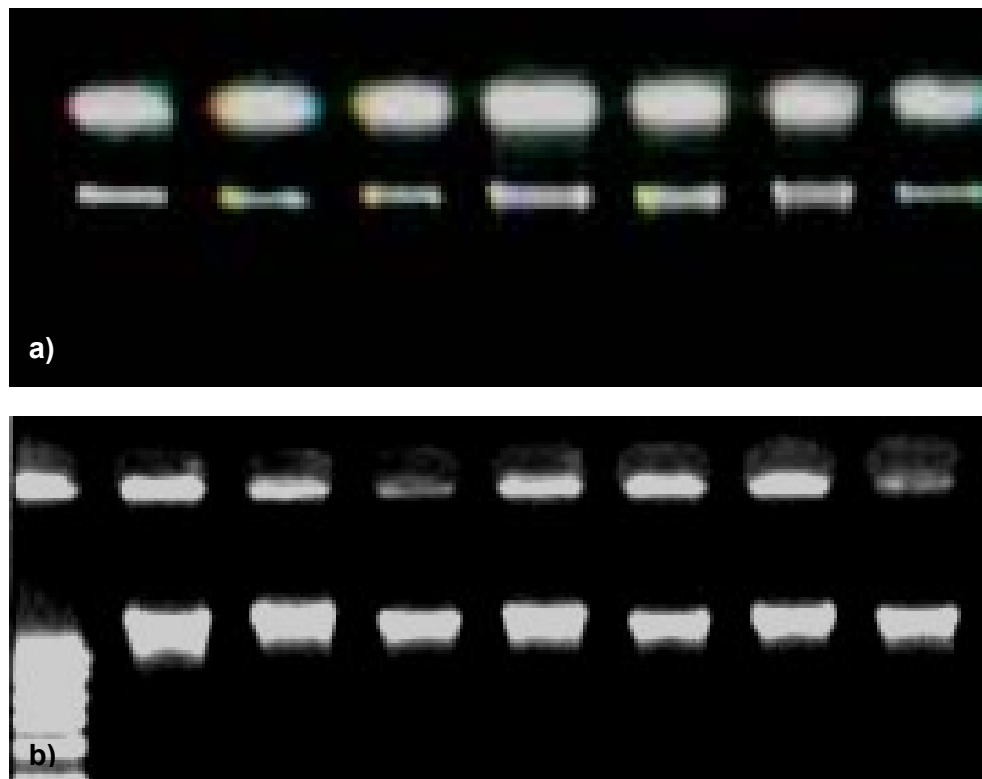


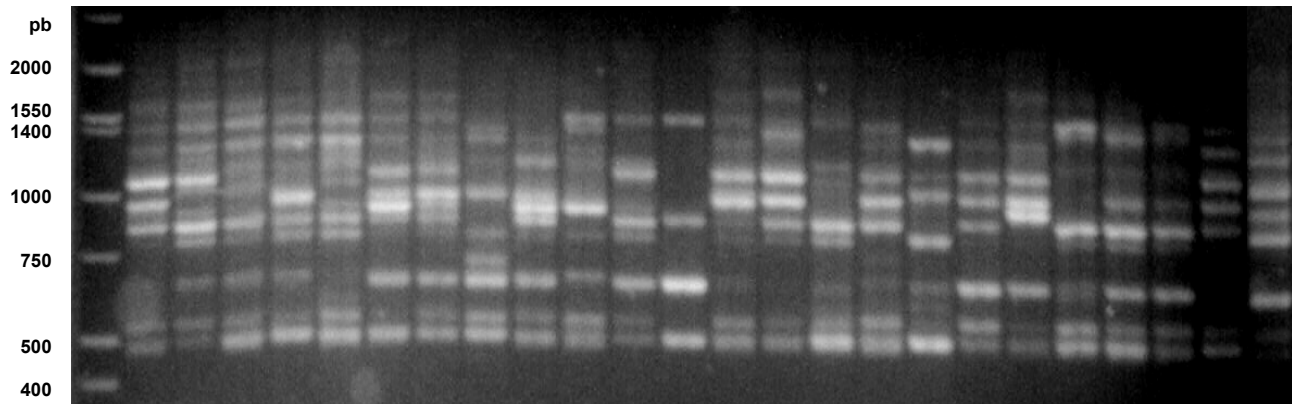
Figura 6. ADN total de *Pinus tecunumanii* de Nicaragua: a) Extraído en el laboratorio de Genética Molecular (UNAN-León); b) Extraído en el laboratorio de Biología Celular y Genética (UAH).

5.2. Análisis de patrones de bandas

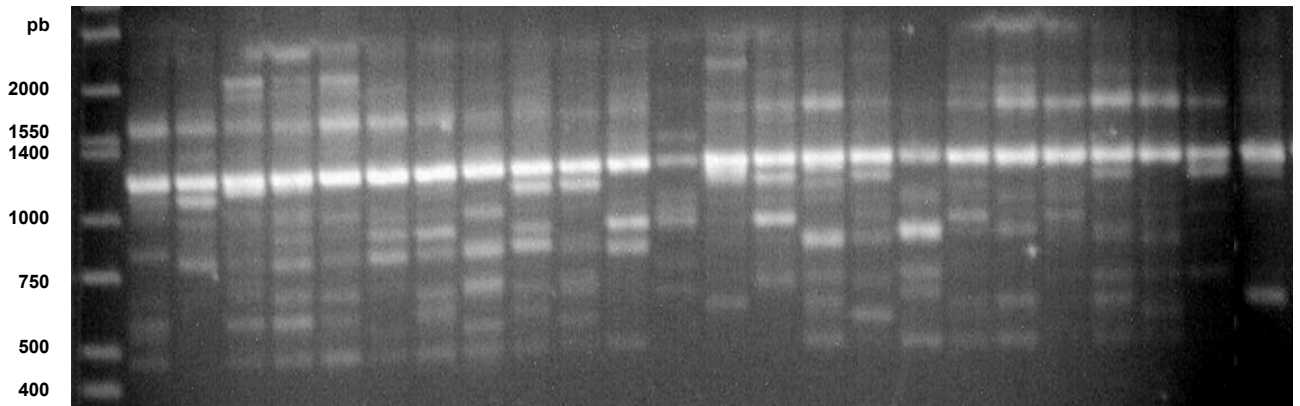
De los 50 cebadores ensayados, 11 produjeron patrones reproducibles y bandas de fácil resolución, los que se utilizaron en los 101 individuos muestreados. Los 11 cebadores generaron un total de 101 bandas con tamaños que variaron de 2000 a 325 pb. El número de bandas varió desde 6, obtenido con el cebador OPS-07, a 14 con el cebador UBC-411. El promedio de bandas por cebador fue de 9.18. En la Tabla 6 puede apreciarse el número de bandas obtenidas por cada cebador y en la Figura 7 se muestran ejemplos de los patrones obtenidos por los cebadores OPS-02 y UBC-411 en individuos de la población de Yúcul.

Tabla 6. Designación y secuencia de los cebadores empleados.

Cebador	Secuencia 5' — 3'	Total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas
OPB-10	CTG CTG GGA C	8	4	4
OPF-01	ACG GAT CCT G	7	1	6
OPG-10	AGG GCC GTC T	7	0	7
OPH-07	CTG CAT CGT G	10	1	9
OPN-09	TGC CGG CTT G	10	1	9
OPR-02	CAC AGC TGC C	9	4	5
OPR-07	ACT GGC CTG A	9	1	8
OPS-02	CTA CTG CGC T	12	1	11
OPS-07	TCC GAT GCT G	6	1	5
OPS-18	CTG GCG AAC T	9	2	7
UBC-411	GAG GCC CGT T	14	1	13
Total		101	17	84
Media por cebador		9.18	1.54	7.64



a.) Producidos por el cebador **OPS-02** en la población de Yúcul.



b.) Producidos por el cebador **UBC-411** en la población de Yúcul.

Figura 7. Patrones RAPD

Los marcadores RAPDs tienen dos características: (1) se analizan en geles en los que aparecen múltiples marcadores por carril (sistema multi-locus), y (2) son marcadores mayoritariamente dominantes. La primera característica implica, que en el análisis de los patrones de bandas no necesariamente cada una de ellas se corresponde con un único locus, ya que podrían producirse bandas de idéntico tamaño procedentes de dos loci distintos. Alternativamente, dos o más bandas de distinta migración podrían resultar alélicas, lo que afectaría al carácter independiente que deben poseer los marcadores utilizados en este tipo de análisis (Díaz, 2001).

El carácter independiente de las bandas analizadas en este estudio, se comprobó mediante un análisis de correlación, no detectándose correlación positiva entre pares de bandas por lo que cada banda fue considerada como un carácter independiente, es decir, como un locus. De las 101 bandas generadas 84 resultaron polimórficas en el total de la muestra analizada. El número de bandas polimórficas por cebador aparece en la Tabla 6.

Con respecto a la segunda característica, la técnica RAPD amplifica fragmentos de ADN que incluye cierta secuencia o secuencias que son reconocidas por el cebador seleccionado. Como resultado, solo individuos que llevan la secuencia específica mostrarán el fragmento, mientras otros no, dando los fenotipos “presencia” o “ausencia” del fragmento, respectivamente. Es difícil o imposible decir si el fragmento está presente en una o dos copias, por lo que no se puede distinguir la condición heterocigota de la homocigota. El fragmento amplificado es por lo tanto tomado en cuenta como dominante y la ausencia del fragmento como condición recesiva (Jorde et al., 1999). El tipo de herencia predominantemente dominante de los RAPDs ha sido confirmada de una forma directa en pinos utilizando el tejido haploide de los megagametofitos de árboles individuales de diferentes especies (Revisiones de Travis et al., 1998 y Remington et al., 1999, entre otros). Como resultado de los estudios anteriores se ha comprobado que el 90% de los marcadores utilizados presentaron segregación mendeliana, ajustándose a un patrón de un locus con dos alelos, dominante y nulo, respectivamente (Díaz, 2001).

La homología de los fragmentos RAPDs fue comprobado directamente en *P. tecunumanii* en un trabajo realizado por Furman et al. (1997), analizando productos de restricción obtenidos en bandas amplificadas en esta especie y el 92% de las bandas analizadas resultaron homólogas, lo que indica la similitud en el contenido de las secuencias amplificadas garantizando, que en la mayoría de los casos provienen del mismo locus.

Cuando se quieren realizar análisis genéticos poblacionales con la información generada por marcadores dominantes, se crea el problema de que como no se pueden distinguir homocigotos de heterocigotos, no se pueden calcular directamente las frecuencias alélicas, por lo que se determinan las frecuencias fenotípicas (presencia–ausencia de banda) y génicas (dominante-recesivo). Sin embargo, el cálculo de las frecuencias alélicas es la más importante puesto que lo que se heredan no son ni los genotipos, ni los fenotipos, que mueren con el individuo, sino los genes que van en los gametos y su variación a lo largo del tiempo es lo que determina el destino de la población (Puertas et. al., 1999). Esta limitante de los marcadores dominantes introduce sesgos en el cálculo de las frecuencias alélicas, por lo que es necesario suponer que las poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

En este estudio, para realizar las estimaciones en las poblaciones de *P. tecunumanii* se puede asumir que estas poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo que no parece ser una suposición errada, por las siguientes razones: (1) Por el tipo de apareamiento (alógama) y (2) Por la polinización a través del viento, es decir, con apareamiento al azar (poblaciones panmícticas), lo que es típico del género *Pinus*. Pero además se utilizó tejido haploide del megagametofito que es considerado una excelente fuente natural para caracterizar directamente alelos individuales usando marcadores moleculares (Álvarez, et al., 2004).

En la Tabla 7 se muestran las frecuencias de bandas polimórficas y los porcentajes de **polimorfismo producido por cada cebador** en cada población. Se observa que todas las 84 bandas polimórficas en el conjunto de la muestra analizada fueron también polimórficas dentro de cada población, por lo que, los porcentajes de polimorfismo detectados por cada cebador fueron similares en las distintas poblaciones, incluso, fueron iguales con los cebadores OPB-10, OPS-02 y UBC-411. Todos los cebadores produjeron bandas polimórficas en todas las poblaciones. Los cebadores de mayor rendimiento en cuanto al polimorfismo detectado (mayores del 90%), fueron: OPG-10, con una media de 97.14% de

polimorfismo, seguido del UBC-411 con una media de 92.86% y el OPS-02 con una media de 91.67%. Por el contrario, OPB-10 produjo solo un 50% de bandas polimórficas por población, pero aún así, es mucho mayor en comparación con los que produjeron menor polimorfismo (cerca del 20%) en *P. oocarpa* (Díaz, 2001).

Tabla 7. Número y porcentaje (entre paréntesis) de bandas polimórficas obtenidas.

Cebadores	Poblaciones					Media
	APA	LBR	MCA	SNI	YUC	
OPB-10	4 (50.00)	4 (50.00)	4 (50.00)	4 (50.00)	4 (50.00)	4 (50.00)
OPF-01	6 (85.71)	6 (85.71)	6 (85.71)	5 (71.43)	6 (85.71)	5.8 (82.86)
OPG-10	7 (100.00)	6 (85.71)	7 (100.00)	7 (100.00)	7 (100.00)	6.8 (97.14)
OPH-07	9 (90.00)	8 (80.00)	9 (90.00)	8 (80.00)	9 (90.00)	8.6 (86.00)
OPN-09	9 (90.00)	9 (90.00)	9 (90.00)	8 (80.00)	9 (90.00)	8.8 (88.00)
OPR-02	5 (55.56)	5 (55.56)	4 (44.44)	5 (55.56)	4 (44.44)	4.6 (48.89)
OPR-07	8 (88.89)	7 (77.78)	8 (88.89)	8 (88.89)	8 (88.89)	7.8 (84.44)
OPS-02	11 (91.67)	11 (91.67)	11 (91.67)	11 (91.67)	11 (91.67)	11 (91.67)
OPS-07	5 (83.33)	5 (83.33)	4 (66.67)	5 (83.33)	5 (83.33)	4.8 (76.67)
OPS-18	6 (66.67)	7 (77.78)	5 (55.56)	5 (55.56)	7 (77.78)	6 (64.44)
UBC-411	13 (92.86)	13 (92.86)	13 (92.86)	13 (92.86)	13 (92.86)	13 (92.86)
Todos los cebadores	83 (82.18)	81 (80.20)	80 (79.21)	79 (78.22)	83 (82.18)	81.2 (80.40)

Ninguna banda se encontró exclusivamente en una población, por lo que las diferencias entre las poblaciones analizadas se debieron a diferencias en las frecuencias de las distintas bandas, además, cada individuo analizado presentó un perfil único de bandas. **El porcentaje medio de polimorfismo por población** para cada uno de los cebadores varió desde el 78.22% en la población de San Nicolás hasta el 82.18% en la población de Apante y Yúcul que presentan el mismo porcentaje de polimorfismo. La media de estos valores fue de 80.40%, muy similar al 79% presentado en *Pinus mugo* Turra de los Alpes (Monteleone et al., 2006) y un poco menor al encontrado en *P. sylvestris* de 88.65 % (Szmids et al., 1996) y en *P. halepensis* de 90.3 (Gómez et al., 2001) en los que también se utilizó megagametofito. Con respecto a las poblaciones nicaragüenses de *P. oocarpa*, en las que se detectó un 50.53% -rango de 48.85% al 51.91%- (Díaz et al., 2001), se puede considerar que la diferencia entre estas dos especies nicaragüenses, es alta.

Los diferentes niveles de polimorfismo encontrado en distintas especies de árboles forestales, puede ser explicada por diversas razones. En la comparación anterior en los primeros casos (especies no nicaragüenses), se trata de especies del mismo género, analizados con la misma técnica (lo que significa que se muestrearon las mismas regiones del genoma) y utilizando el mismo tipo de tejido (megagametofito), por lo que obviamente, las diferencias encontradas se deben a las características históricas y ecológicas en la vida de cada una de las especies, a como lo reportan Hamrick et al. (1992) en un estudio sobre los factores que influyen en los niveles de diversidad genética en especies de plantas maderables, en el que afirman, que estas características explican una proporción significativa (34%) de las diferencias encontradas entre especies y que la historia evolutiva de cada especie puede jugar un rol importante para determinar el nivel y distribución de la diversidad genética.

Con respecto a la comparación de los datos obtenidos haciendo uso de la misma técnica, en las poblaciones nicaragüenses de *P. tecunumanii* con las de *P.*

oocarpa, las cuales incluso comparten las mismas áreas de distribución geográfica y por lo tanto poseen prácticamente la misma historia evolutiva y ecológica, se podría explicar la diferencia entre los resultados por el tipo de tejido analizado. Esta diferencia se ha encontrado también en otros estudios, por ejemplo en el de Lu et al. (1995) a como lo cita Hurme y Savolainen (1999), reportan que diferentes tejidos (haploide y diploide) del mismo organismo puede dar diferentes resultados en las amplificaciones, a como ellos lo encontraron en pinos. Esto es debido principalmente, a la baja reproducibilidad que posee la técnica RAPD que junto con la dominancia, constituyen sus principales debilidades. Con estas consideraciones, es probable que incluso las condiciones experimentales entre los diferentes laboratorios y los mayores errores experimentales a que están sometidos los marcadores RAPD causados principalmente por las bajas temperaturas de anillamiento empleada en las reacciones de amplificación (Karp y Edwards, 1997) pueda estar influyendo en la diferencia de resultados.

Cuando se comparan los resultados de este estudio con los de *P. oocarpa* donde se utilizaron otros tipos de marcadores como AFLP, en el cual se obtuvo un porcentaje medio de polimorfismo de 37.86% (rango de 35.97% al 39.54%) (Díaz et al., 2001) y en RGAP de 44.28% (rango de 41.96% al 46.43%) en las mismas poblaciones (Díaz y Ferrer, 2003) en *P. tecunumanii* los resultados fueron mucho más altos. La principal diferencia metodológica del trabajo en *P. tecunumanii* utilizando RAPD con los mencionados anteriormente, es por supuesto, las diferentes técnicas utilizadas que revelan:

1.) Polimorfismos procedentes de diferentes regiones del ADN, por ejemplo, tanto los marcadores RGAPs, que generan información de secuencias de ADN homólogas a genes de resistencia o a otro tipos de genes (en cualquier caso son regiones codificantes), como los AFLPs, que producen información de regiones no metiladas del genoma que también son codificantes (también hay regiones repetidas no metiladas, pero en menor medida). En cambio los RAPD,

que están ampliamente distribuidos en el genoma cuyo contenido es principalmente no codificante, revelan información mayoritaria de estas secuencias que al no estar sometidas a selección natural tienen mayores índices de mutaciones, por lo tanto mayores niveles de polimorfismo, como se pone de manifiesto en estos estudios. El alto nivel de diversidad encontrada en estas especies, se origina probablemente en el tamaño de su genoma. Se considera que el género *Pinus* tiene genomas desde 19.5 a 26.5 pg. (O'Brien et al., 1996), gran parte del cual es repetitivo.

2.) Tanto en los marcadores RGAPs como en los AFLPs se utilizan sistemas de geles más fiables puesto que poseen mayor poder de resolución, como son los geles de poliacrilamida. Otra diferencia obviamente importante es el tipo de tejido analizado, que en este trabajo es haploide como ya se discutió anteriormente.

En cambio, cuando se consideraron exclusivamente las bandas polimórficas en el conjunto de la muestra analizada, el porcentaje medio de polimorfismo en este estudio fue del 96.67%, igualmente superior al encontrado en *P. oocarpa* (83.75 %).

Con estos resultados podemos afirmar que el porcentaje de polimorfismo encontrado en las poblaciones analizadas de *P. tecunumanii*, fue alto, lo que se puede considerar como normal, puesto que es sabido que el sistema de apareamiento, la estructura floral y el modo de reproducción de las especies influyen significativamente en la extensión y distribución de la diversidad genética. Es ampliamente conocido que las gimnospermas y otras especies con similares características reproductivas, como alta fecundidad, longevidad, fecundación cruzada y polinización por el viento, presentan altos niveles de diversidad genética (Ramanatha y Hodgkin, 2002). Lo que es más evidente para los pinos que son considerados como el género de plantas más variable genéticamente, lo que

inicialmente se reveló en medidas de variación genética cuantitativa y diversidad en loci alozímicos (Cornelius, 1994 y Hamrick y Godt, 1989).

Inicialmente se esperaba que estas poblaciones muestreadas después del ataque del gorgojo descortezador (*Dendroctonus frontalis*) presentaran una reducida diversidad genética, (probablemente es menor a la que tendrían antes de que sufrieran reducción en sus tamaños a causa de esta plaga) sin embargo, hay que señalar que ninguna de las poblaciones muestreadas mostraron daños severos causados por el ataque del gorgojo, como fue evidente en Nueva Segovia que fue la zona mayormente afectada, y donde no se pudieron obtener muestras de Las Camelias como se explicó anteriormente y que era de gran interés para este estudio.

5.2. Diversidad intrapoblacional

Las estimaciones de la diversidad utilizando frecuencias fenotípicas (H_j) se calcularon separadamente para cada cebador en cada una de las 5 poblaciones. La media de los valores obtenidos con cada cebador indica el valor de la diversidad fenotípica de cada población (H_f). Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 8.

Algunos cebadores revelaron niveles similares de diversidad entre las poblaciones, destacándose por ello OPS-02. Otros en cambio, de forma similar a como ocurrió en el porcentaje de polimorfismo, revelaron niveles diferentes de diversidad, sobresaliendo entre ellos el cebador OPR-02, desde un $H_j=0.189$ en Yúcul a $H_j= 0.428$ en San Nicolás, lo que corrobora la necesidad de utilizar un buen número de cebadores RAPDs para minimizar un posible sesgo en el análisis intrapoblacional. Lo que no es necesario con otro tipo de marcadores como AFLPs y RGAPs, lo que resultó evidente en el estudio de *P. oocarpa* (Díaz, 2001).

Tabla 8. Estimaciones de la diversidad fenotípica intrapoblacional

Cebadores	Poblaciones				
	APA	LBR	MCA	SIN	YUC
OPB-10	0.453 ± 0.306	0.376 ± 0.263	0.410 ± 0.283	0.426 ± 0.290	0.409 ± 0.279
OPF-01	0.487 ± 0.299	0.369 ± 0.237	0.400 ± 0.255	0.391 ± 0.249	0.432 ± 0.267
OPG-10	0.391 ± 0.243	0.412 ± 0.252	0.376 ± 0.235	0.407 ± 0.250	0.350 ± 0.219
OPH-07	0.388 ± 0.232	0.339 ± 0.205	0.401 ± 0.238	0.406 ± 0.240	0.291 ± 0.179
OPN-09	0.439 ± 0.258	0.414 ± 0.243	0.449 ± 0.263	0.371 ± 0.222	0.392 ± 0.231
OPR-02	0.230 ± 0.174	0.387 ± 0.255	0.290 ± 0.207	0.428 ± 0.277	0.189 ± 0.150
OPR-07	0.457 ± 0.271	0.399 ± 0.240	0.460 ± 0.273	0.410 ± 0.246	0.413 ± 0.245
OPS-02	0.419 ± 0.241	0.416 ± 0.237	0.422 ± 0.243	0.434 ± 0.247	0.393 ± 0.224
OPS-07	0.357 ± 0.242	0.392 ± 0.258	0.332 ± 0.229	0.387 ± 0.256	0.328 ± 0.223
OPS-18	0.309 ± 0.201	0.362 ± 0.226	0.247 ± 0.169	0.259 ± 0.174	0.370 ± 0.229
UBC-411	0.352 ± 0.203	0.363 ± 0.206	0.398 ± 0.226	0.320 ± 0.186	0.396 ± 0.222
Todos los cebadores (H_f)	0.391 ± 0.200	0.384 ± 0.195	0.389 ± 0.199	0.381 ± 0.194	0.367 ± 0.183

Diversidades fenotípicas obtenidas con cada cebador " H_j " y los valores considerando todos los cebadores para cada población " H_f " (\pm desviaciones típicas).

En cuanto a los valores medios de **diversidad fenotípica** en cada población, podemos observar que la población de Yúcul es la presenta menor valor de diversidad ($H_f=0.367$) y la de Apante el mayor valor ($H_f=0.391$), aunque hay que destacar que la diferencia no es muy grande. El valor medio en total de

las 5 poblaciones fue de 0.382, resultando nuevamente superior al obtenido en poblaciones nicaragüenses de *P. oocarpa*, donde se obtuvo una diversidad fenotípica media de 0.358, variando de 0.317 a 0.381 (Díaz et al. 2001). Los valores en *P. tecunumanii* son bastantes similares a los encontrados en *P. oocarpa* pero con otros tipos de marcadores. Las diversidades fenotípicas medias fueron con AFLP (0.342) y con marcadores RGAPs (0.374), Díaz et al. (2001) y Díaz y Ferrer (2003) respectivamente.

Los valores de diversidad intrapoblacional estimados a partir de las **frecuencias alélicas** (diversidad génica) para cada locus aparecen en la Tabla 9 donde también aparecen los valores medios de polimorfismo y diversidad fenotípica para cada población, de las Tablas 7 y 8, para facilitar la comparación entre los diferentes valores. El valor medio de diversidad génica en la muestra analizada fue de 0.373. En concordancia con los datos fenotípicos Yúcul mostró el menor grado de diversidad ($H_g=0.359$) y Apante el mayor ($H_g=0.380$). En todos los casos, las estimaciones de la diversidad fenotípica fueron ligeramente superiores a los correspondientes de diversidad génica (véase Figura 8) donde se representan las diversidades fenotípicas y génicas). Al aplicar la prueba de la *t* para muestra apareadas, las diferencias aunque muy pequeñas entre los grupos de valores de diversidad, resultaron significativas ($t=9.489$; $P<0.05$). El coeficiente de correlación (*r*) es igual a 0.975 ($P<0.01$), lo que indica una correlación relativamente fuerte entre las variables, la cual es estadísticamente significativa.

Los valores H_g obtenidos en esta investigación (0.373), fueron ligeramente superiores a los presentados con RAPD en *P. oocarpa* (Díaz, 2001), cuya diversidad génica media fue de 0.344 con un rango de 0.309 a 0.358, a los de *Pinus mugo* (Monteleone et al., 2006), diversidad génica media de 0.321 (rango de 0.227 a 0.397) y a los presentados por *Pinus longaeva* (Lee et al., 2002), donde la diversidad génica media fue de 0.321, a los de *Pinus massoniana* (Peng et al., 2003), H_g medio=0.2451 con rango de 0.212 a 0.262. Por el contrario, comparado con *Pinus contorta* (Thomas et al., 1999) con una media de 0.46, estos valores

fueron un poco bajos. Con todo esto podemos decir que los valores de diversidad intrapoblacional H_f y H_g de *P. tecunumanii* están dentro de un rango intermedio con respecto a los estudios anteriormente señalados.

Si ordenamos de mayor a menor a las 5 poblaciones de *P. tecunumanii*, según sus diversidades fenotípicas y génicas, obtenemos el siguiente orden: Apante ($H_f=0.391$ $H_g=0.380$), Monte Carmelo ($H_f=0.389$ $H_g=0.378$), La Brellera ($H_f=0.384$ $H_g=0.378$), San Nicolás ($H_f=0.381$ $H_g=0.371$) y Yúcul ($H_f=0.367$ $H_g=0.359$).

Tabla 9. Valores de polimorfismo y diversidad en las 5 poblaciones analizadas.

Población	P	P_T	P_P	H_f	H_g
Apante	83	82.18	98.81	0.391 ± 0.200	0.380 ± 0.139
La Brellera	81	80.20	96.43	0.384 ± 0.195	0.378 ± 0.135
Monte Carmelo	80	79.21	95.24	0.389 ± 0.199	0.378 ± 0.148
San Nicolás	79	78.22	94.05	0.381 ± 0.194	0.371 ± 0.151
Yúcul	83	82.18	98.81	0.367 ± 0.183	0.359 ± 0.139
Media	81.2	80.40	96.67	0.382 ± 0.009	0.373 ± 0.009

Número de bandas polimórficas (P), porcentaje de polimorfismo sobre el total de bandas (P_T) y sobre el total de bandas polimórficas (P_P), estimaciones de la diversidad fenotípica media por cebador (H_f) y diversidad génica media por locus (H_g).

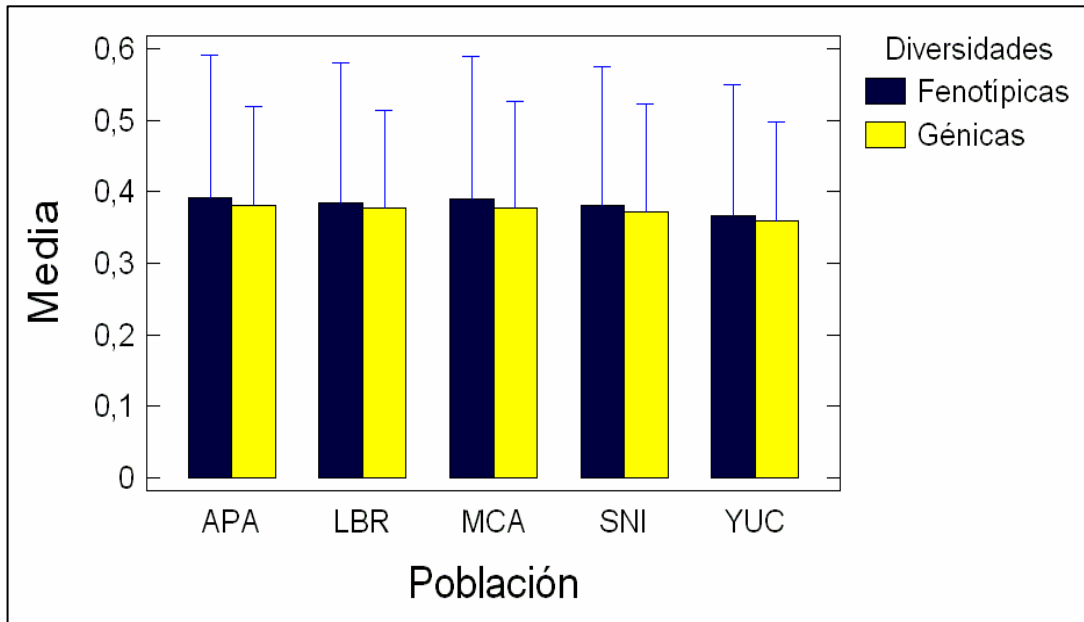


Figura 8. Representación de las estimaciones de diversidad fenotípica y diversidad génica encontrada con marcadores RAPDs en *P. tecunumanii*.

Generalmente para hacer las estimaciones de frecuencias alélicas cuando se utiliza tejido diploide es necesario suponer que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, en este trabajo se utilizó el tejido nutritivo haploide derivado del gametofito femenino llamado megagametofito de las semillas, el cual constituye el tejido nutritivo del embrión en la semilla madura. Los megagametofitos resultan de las divisiones repetidas mitóticas de un solo producto de una división meiótica y tiene el mismo complemento genético maternal tal como el embrión contenido en la misma semilla (Kubisiak et al., 1995 y Nelson et al., 1993).

Aunque los marcadores RAPDs tienen tipo de herencia dominante, en gimnospermas, la disponibilidad de los megagametofitos haploides, representando las contribuciones maternas del embrión, permite la discriminación de todas las clases de genotipos sin ambigüedad y la estimación de parámetros genéticos con precisión (İçgen et al., 2006 y Zhivotovsky, 1999). Por lo que los genotipos

inferidos del tejido haploide son utilizados para realizar una estimación directa de las frecuencias alélicas (segregación uniparental). Los mayores valores, tanto de diversidad fenotípica como de diversidad génica encontrados en *P. tecunumanii* con respecto a *P. oocarpa*, se explican nuevamente en base al tipo de tejido utilizado, puesto que Szmidt et al., (1996) determinaron en *P. sylvestris* que cuando los datos tanto del porcentaje de loci polimórficos, como de la heterocigosidad esperada, se derivan de tejido diploide son más bajos – 50.0 y 0.223 – (como en el estudio de *P. oocarpa*) que cuando se derivan de tejido haploide – 90.9% y 0.356 – (como en el estudio en *P. tecunumanii*). Estos autores consideran que debido a la dominancia de los RAPDs las estimaciones de las frecuencias génicas obtenidos de material diploide son menos precisos, debido a que el homocigoto nulo no es detectado y en muchos loci aparecen como monomórficos en los datos diploides.

A pesar de que las poblaciones de *P. tecunumanii* se encuentran al límite de su distribución geográfica, donde se considera que las poblaciones tienen menores diversidades genéticas debido al pequeño tamaño de las poblaciones, al reducido flujo de genes, desfavorables condiciones climáticas (Ramanatha y Hodgkin, 2000; Michaud et al.,1995) como se ha encontrado en diferentes estudios (Hamrick y Godt, 1989; Millar y Marshall, 1992, entre otros), sin embargo, esta especie presentó altos niveles de diversidad. Muchos estudios han fallado para detectar variación genética reducida en poblaciones periféricas con respecto a poblaciones centrales de la especie, por ejemplo, en un estudio reciente en las poblaciones marginales de la especie *Pinus canariensis*, se encontró alta diversidad genética (Vaxevanidou et al. 2006). Van Rossum et al. (1997), consideran que una posible explicación a estos resultados contradictorios posiblemente se deba a que el término “marginal” en algunos casos se aplica a poblaciones que simplemente están en el filo del rango de distribución de la especie, pero que no tienen tan reducido su tamaño, ni el flujo de genes.

5.3. Diferenciación entre poblaciones

Para determinar la diferenciación entre poblaciones, se requiere de los valores de diversidad fenotípica intrapoblacional (H_j) obtenida con cada cebador y a partir de ellos estimar la diversidad fenotípica intrapoblacional media por población revelados por cada cebador (H_{POP}), los correspondientes valores en el conjunto de la muestra analizada (H_T), la proporción de la diversidad total atribuible a diferencias dentro de poblaciones (H_{POP}/H_T) y finalmente poder calcular la atribuible a **diferencias entre poblaciones** (G_{ST}), todos estos datos se muestran en la Tabla 10.

Aunque existen diferencias entre cebadores, la mayor parte de la diversidad total se debe a diferencias entre los individuos dentro de una misma población (intrapoblacional) con una media de 0.938. El cebador OPR-07 muestra que existen más diferencias entre individuos de una misma población que entre individuos de distintas poblaciones. El cebador que originó el mayor valor de diferenciación entre poblaciones fue OPR-02 ($G_{ST} = 0.197$).

Promediando los valores obtenidos con los 11 cebadores utilizados, el 6.2% de diversidad fenotípica es atribuible a diferencias interpoblacionales, mientras el 93.8% restante de la diversidad es debido a diferencias intrapoblacionales. Al igual que en el presente estudio, en *P. oocarpa* (Díaz et al., 2001; Díaz y Ferrer, 2003), se detectó mayor diversidad intrapoblacional que interpoblacional, siendo la diversidad interpoblacional de 11.2%, 7.3% y 8.8% con marcadores RAPDs, AFLPs y RGAPs, respectivamente. En *P. mugo* (Monteleone et al., 2006), la diversidad interpoblacional fue aún más alta (22.5%), pero siempre conservándose la diversidad total, atribuible en un mayor porcentaje a la diversidad intrapoblacional. En *P. massoniana* (Huang y Zhang, 2000) utilizando alozimas también se presentó mayor diversidad intrapoblacional que interpoblacional, pero la diversidad interpoblacional fue aún mucho menor (2%).

Las diferencias en los datos encontrados entre especies diferentes ya se analizaron anteriormente.

Tabla 10. Distribución de la diversidad fenotípica intra e interpoblacional estimada a partir de 11 cebadores en las 5 poblaciones analizadas.

Cebador	H _{POP}	H _T	H _{POP} /H _T	G _{ST} (H _T -H _{POP} /H _T)
OPB-10	0.415	0.457	0.908	0.091
OPF-01	0.416	0.419	0.993	0.007
OPG-10	0.387	0.407	0.951	0.049
OPH-07	0.365	0.390	0.936	0.064
OPN-09	0.413	0.437	0.945	0.055
OPR-02	0.305	0.380	0.803	0.197
OPR-07	0.428	0.423	1.012	-0.012
OPS-02	0.417	0.440	0.948	0.052
OPS-07	0.359	0.384	0.935	0.065
OPS-18	0.309	0.327	0.945	0.055
UBC-411	0.366	0.388	0.943	0.057
Media	0.380	0.405	0.938	0.062

También se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), cuyos resultados se muestran en la Tabla 11. Este análisis confirmó que la mayor parte de la variación fenotípica total se debe a diferencias entre individuos dentro de las poblaciones (92.85%). El AMOVA permitió calcular el valor de Φ_{ST} que resultó ser 0.072 parecido al estimado a partir de las diversidades fenotípicas ($G_{ST}=0.062$). El valor fue significativo, indicando que existe diferenciación entre las cinco poblaciones analizadas. La diferencia del valor obtenido de la variación intrapoblacional y atribuible a diferencias entre poblaciones fue baja (7.15%), aunque significativa, indicando la existencia de diferenciación interpoblacional.

En comparación con *P. oocarpa* (Díaz et al., 2001 y Díaz y Ferrer, 2003), la diversidad intrapoblacional fue mayor a la diversidad interpoblacional, igual a lo

sucedido en el presente estudio. Los valores de diversidad intrapoblacional fueron de 87.77% para RAPD, 91.37% para AFLP y 91.36% para RGAP; mientras que los valores de diversidad interpoblacional fueron de 12.23%, 8.53% y 8.61% para RAPD, AFLP y RGAP, respectivamente. Como se puede observar, los valores de RAPDs fueron un poco diferentes, mostrando un poco menos de diversidad intrapoblacional y más de diversidad interpoblacional. Sin embargo, cuando se comparan sólo con las poblaciones de la Región Central de *P. oocarpa* (la misma región que pertenecen las de *P. tecunumanii*) la diferencia disminuye considerablemente puesto que la diferenciación interpoblacional es de 0.083 y 0.072 respectivamente.

Continuando con la comparación de niveles de diferenciación encontrados en otras especies de pinos analizados con la misma técnica, en algunos casos se encuentran valores superiores, como por ejemplo, en *P. leucodermis* se reporta un valor medio de Φ_{ST} de 0.179 (Bucci et al., 1997) y en *P. flexilis* el valor F_{ST} superior a 0.1 (Latta y Mitton, 1997) y más recientemente Vaxevanidou et al., (2006) en poblaciones marginales de pinos en la Isla Canaria encontraron valores de F_{ST} de hasta 0.27, probablemente debido al alto grado de aislamiento de las poblaciones. En cambio se han encontrado valores inferiores como 0.011 en *P. squamata* (Zhang et al., 2005). En *Pinus massoniana* la diferenciación interpoblacional fue de 12.43 %. En otras especies forestales como *Cedrela odorata* (Gillies et al., 1997) se observa que la diversidad interpoblacional al igual que en pinos es menor (35.34%) que la intrapoblacional (65.1%) pero con valores inferiores.

Tabla 11. Resultados del análisis de AMOVA considerando las 5 poblaciones muestreadas

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	4	163.474	1.234	7.15***	$\Phi_{ST} = 0.072$
Dentro de poblaciones	96	1538.001	16.021	92.85***	
Total	100	1701.475	17.255		

***P<0.001

Test de significancia después de 1000 permutaciones

Para conocer las relaciones entre pares de poblaciones en cuanto a la mayor o menor diferenciación existente entre ellas, se extrajeron los valores Φ_{ST} entre todos los pares de poblaciones. Estos valores aparecen en la Tabla 12. Todos los valores resultaron significativos, comprobándose que existe diferencia entre estas poblaciones.

Tabla 12. Valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones

	Apante	La Brellera	Monte Carmelo	San Nicolás
La Brellera	0.082			
Monte Carmelo	0.069	0.022		
San Nicolás	0.080	0.052	0.033	
Yúcul	0.075	0.065	0.084	0.131

Los estadísticos G y Φ , análogos a los F de Wright, tienen un rango teórico de cero, que indicaría la no existencia de divergencia genética, a uno, que

indicaría fijación de alelos alternativos en las poblaciones, el valor máximo observado es generalmente mucho menor que uno (Hartl, 1987). Debido a lo anterior Wright (1978) sugirió una escala en donde el rango de 0 a 0.05 indica poca diferenciación; de 0.05 a 0.15 moderada; de 0.15 a 0.25 grande y por encima de 0.25 diferenciación muy grande. De acuerdo a esto, tanto los valores obtenidos utilizando diversidades fenotípicas con 93.8% ($G_{ST}=0.062$), como génicas con 92.4% ($G_{ST}=0.076$) y similares al obtenido con AMOVA ($\Phi_{ST} = 0.072$), reflejan claramente que la mayor diversidad genética está dentro de las poblaciones, lo que para estos estimados se corresponde a una moderada diferenciación, según Wright (1978). Es decir, las cinco poblaciones de *P. tecunumanii* analizadas en este estudio aún poseen una moderada diferenciación genética. El mismo nivel de diferenciación fue encontrado consistentemente con los tres tipos de marcadores utilizados en las poblaciones de *P. oocarpa*.

Con respecto a estos resultados en primer lugar, el hecho de que la mayor variabilidad genética se encuentre dentro de las poblaciones es un hecho muy bien documentado con diferentes tipos de marcadores para las especies alógamas en general, lo que es especialmente notable en las especies del género *Pinus* y en otras gimnospermas con similares características reproductivas (Díaz, 2001). Las coníferas polinizadas por el viento típicamente muestran niveles muy altos de variación genética dentro de poblaciones y relativamente menos diferenciación entre poblaciones (Thomas et al., 1999).

En cuanto a los valores de divergencia entre poblaciones encontrados en este estudio se puede decir que el nivel de diferenciación entre poblaciones es bajo, lo cual puede ser atribuido al efecto de migración o flujo de genes entre las poblaciones analizadas, lo que se puede interpretar que, a mayor flujo de genes hay entre las poblaciones, éstas comparten más alelos. Esto es de gran importancia en las especies alógamas polinizadas por el viento. Sin embargo, en este estudio el coeficiente de correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas, resultó no significativo, por ejemplo, entre Yúcul y Apante que se

encuentran a sólo 15 Km presenta una diferenciación intermedia con el resto de valores F_{ST} entre pares de poblaciones. Por el contrario, uno de los pares de poblaciones que presenta mayor distancia geográfica (66 Km) son La Brellera y Monte Carmelo que presentan el menor valor Φ_{ST} (0.022), a diferencia del otro par de poblaciones (Yúcul – San Nicolás) que también con la máxima distancia de 66Km, sí presentan el mayor valor Φ_{ST} . Esto nos indica que también hay otras fuerzas actuando sobre estas poblaciones. Muchos autores sostienen que la mayor parte de la variación molecular es selectivamente neutral o casi neutral y que los patrones observados de diferenciación genética entre poblaciones de la misma especie estarían determinados por la interacción entre migración-deriva genética (Moritz y Hillis, 1996; Hamrick y Godt, 1989, respectivamente)

5.4. Relaciones filogenéticas

Generalmente se hacen inferencias sobre procesos poblacionales como por ejemplo el flujo de genes, a partir de interrelaciones entre muestras individuales o interpoblacionales, basadas en los resultados de diagramas fenéticos tales como árboles neighbor-joining. Por ejemplo, grupos de individuos de diferentes poblaciones dentro de un mismo grupo en un dendrograma ha sido interpretado como evidencia de flujo de genes entre estas poblaciones; por el contrario, cuando forman agrupamiento solo individuos de acuerdo a sus procedencias poblacionales (no mezclados), se ha tomado como evidencia para aislamiento genético de las poblaciones. De igual manera se puede interpretar, cuando los agrupamientos son por poblaciones y no por individuos como en este estudio. Así los resultados de mayor o menor proximidad genética entre las poblaciones de *P. tecunumanii* se representan gráficamente en el dendrograma realizado a partir de la matriz de distancias genéticas de Reynolds et al. (Tabla 13 y Figura 9). En el dendrograma se aprecian dos grupos principales. En uno de ellos se agruparon tres de las cinco poblaciones, con Monte Carmelo y La Brellera quienes mostraron el menor valor Φ_{ST} , es decir, la mayor proximidad (0.022). En este mismo grupo aparece San. Nicolás. En el otro grupo, están las otras dos poblaciones restantes,

Yúcul y Apante que presentaron un grado de diferenciación medio (0.078). El dendrograma obtenido puede ser considerado consistente con la matriz original ya que el valor del coeficiente de correlación de Mantel entre la matriz original y la cofenética del dendrograma fue de 0.709 ($P=0.986$).

El coeficiente de correlación calculado entre distancias geográficas entre poblaciones y los correspondientes valores de distancias genéticas fue de $r=0.147$, no significativamente distinto de cero ($P>0.12$).

Tabla 13. Matrices de distancias genéticas de Reynolds et al. (1983) -por encima de la diagonal- y de Nei (1978) -por debajo de la diagonal-.

	APA	LBR	MCA	SNI	YUC
Apante (APA)	*	0.085	0.071	0.083	0.078
La Brellera (LBR)	0.075	*	0.022	0.053	0.067
Monte Carmelo (MCA)	0.067	0.031	*	0.034	0.087
San Nicolás (SNI)	0.073	0.050	0.039	*	0.141
Yúcul (YUC)	0.065	0.057	0.071	0.108	*

En el dendrograma obtenido utilizando las distancias genéticas no sesgada de Nei (1978) (Tabla 13) se muestra en la Figura 10 donde se observan los mismos agrupamientos que en el obtenido a partir de las distancias de Reynolds et al. (1983). Se encontró una correlación positiva y significativamente distinta de cero entre ambas matrices de distancias ($r=0.994$). Los resultados del bootstrap en el que se prueba la consistencia de estas relaciones, se pueden considerar como de un buen nivel de fiabilidad para las poblaciones de Yúcul y Apante que se agruparon en el 75.2% de las réplicas. Sin embargo, las poblaciones de Monte Carmelo, La Brellera y San Nicolás se agruparon en el 52.9% de las réplicas, con un menor nivel de fiabilidad.

En cuanto al primer grupo que lo conforman Yúcul y Apante, quienes a pesar de tener la menor distancia geográfica (15 Km) presentan una moderada diferenciación genética ($\Phi_{ST} = 0.075$) entre ellas, lo que probablemente se deba a que Apante se puede considerar seguramente una población natural, puesto que no tiene ningún plan de manejo; mientras que Yúcul tiene varias décadas de ser considerada una reserva genética, la cual en diferentes momentos posiblemente ha tenido algún plan de manejo y conservación, los cuales no han incluido información genética. Ha sido muy bien sustentado que las poblaciones manejadas tienden a reducir su variabilidad genética y quizás sea debido a ello que la población de Yúcul es la que presenta menor valor de diversidad genética comparado al resto de las poblaciones.

El segundo grupo está constituido por La Brellera, Monte Carmelo y San Nicolás, que en cuanto a su distribución geográfica prácticamente están rodeando a las poblaciones del otro grupo. Dado que no se encontró correlación significativa entre los dos tipos de distancias (genéticas y geográficas) es obvio que todas las poblaciones de este grupo se asocian por presentar los menores valores de diferenciación entre ellas (de 0.022 a 0.052) como se observa en la Tabla 11.

Además de las explicaciones anteriores, es bueno señalar que se ha reportado que la variación en la cantidad o extensión de la diferenciación genética entre poblaciones, el número de marcadores analizados y la interacción de estos factores afectan la topología del árbol o dendrograma (Hollingsworth y Ennos, 2004). Estos autores en su estudio realizando simulaciones asociadas al análisis con neighbour-joining, muestran que mientras la subsecuente estructura genética de la población es un determinante importante de la forma del árbol en el análisis con datos generados con marcadores dominantes, el número de loci examinados también afecta la topología. Ellos ponen como ejemplo que cuando se encuentran bajos niveles de diferenciación poblacional, $F_{ST}=0.07$, (exactamente igual al encontrado en *P. tecunumanii*) se generan árboles con agrupamientos que contienen dentro individuos exclusivos de sus respectivas poblaciones, sólo si se

analizan gran número de loci, como unos 250 loci, (típico de muchos estudios de AFLP). Estos autores concluyen que no existe una relación sencilla entre el aislamiento genético y la partición de la variación genética entre las poblaciones por un lado y el agrupamiento de individuos (o poblaciones en este caso) en un árbol neighbour joining por el otro lado. Los resultados dependen del número de loci estudiados. En *P. tecunumanii* el número de loci analizados en este estudio fue de 84 loci polimórficos, número típico de datos RAPDs por lo que se podría considerar también la conclusión del estudio reportado por Hollingsworth y Ennos (2004).

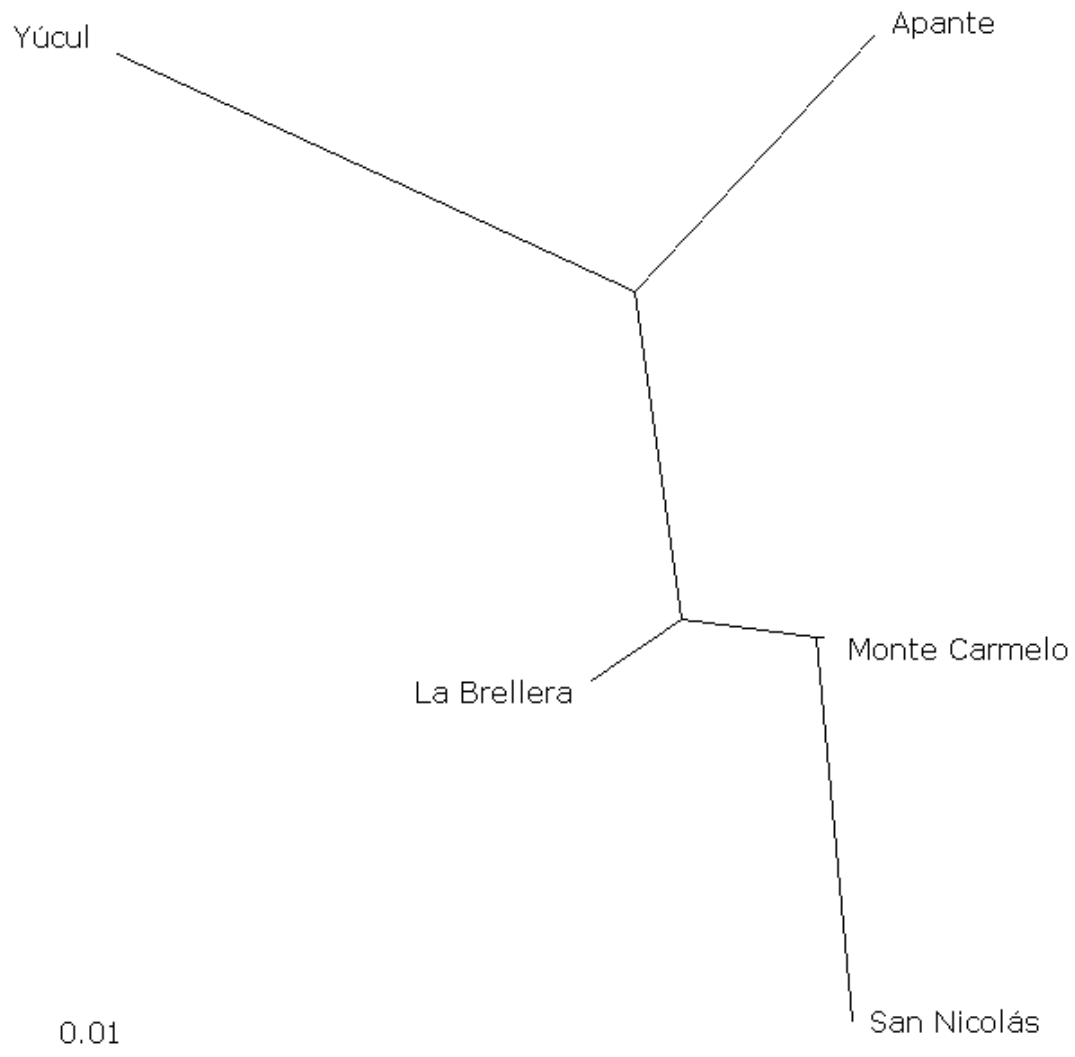


Figura 9. Análisis Neighbour-joining mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de *Pinus tecunumanii* utilizando marcadores RAPDs: Árbol obtenido a partir de las distancias genéticas de Reynolds et al. (1983).

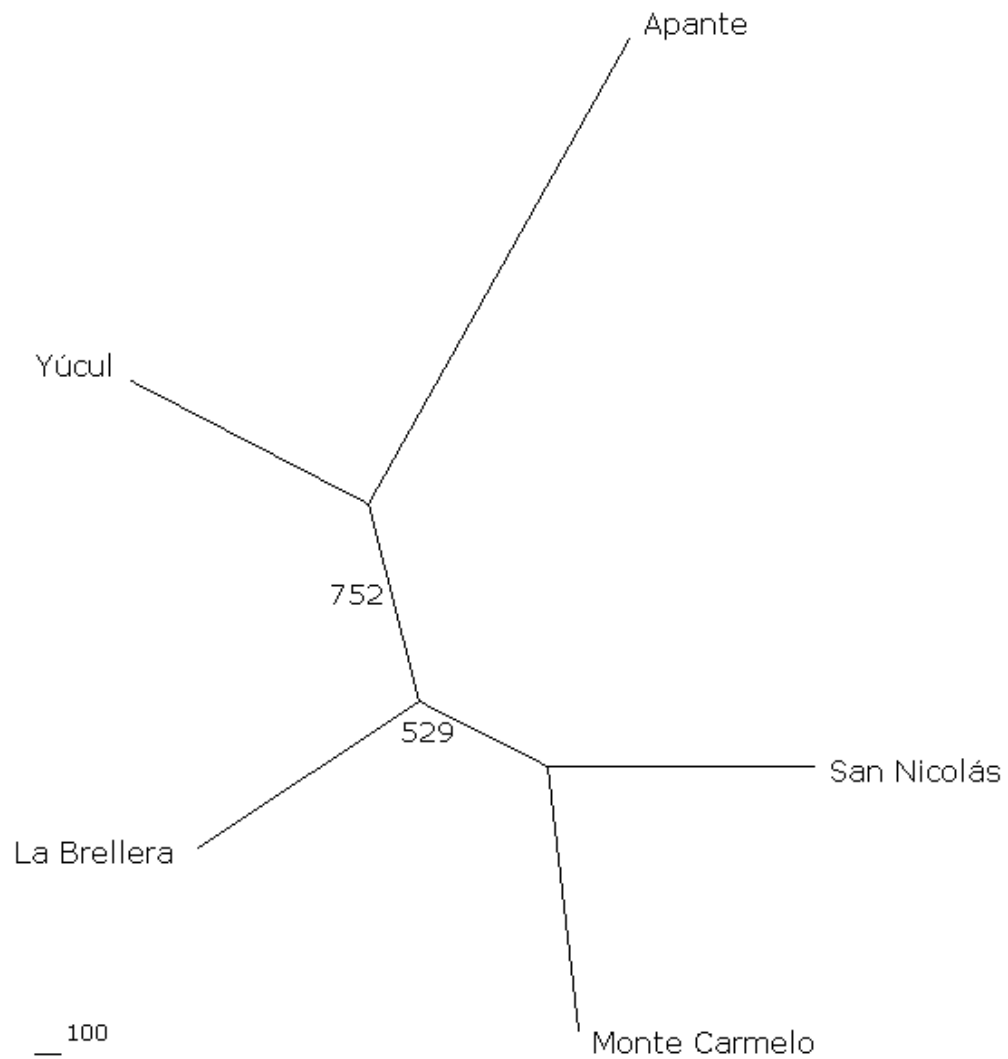


Figura 10. Análisis Neighbour-joining mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de *Pinus tecunumanii* utilizando marcadores RAPDs: Árbol obtenido a partir de distancias genéticas de Nei (1978).



Los resultados obtenidos en este estudio para determinar la diversidad genética presente en las poblaciones naturales de *Pinus tecunumanii* de Nicaragua, utilizando marcadores RAPDs permiten hacer las siguientes conclusiones:

- 🌲 El grado de polimorfismo en *Pinus tecunumanii* fue alto (80.40%). Los valores medios tanto de diversidad fenotípica ($H_f=0.382$) como génica ($H_g=0.373$) fueron muy similares. La población de Yúcul presentó el menor valor de diversidad y Apante el mayor valor. Estos niveles de diversidad son altos.
- 🌲 La diversidad genética debida a la diferenciación entre individuos dentro de las poblaciones de *P. tecunumanii* fue alta 93.8% ($H_{POP}/H_T=0.938$) y 92.9% (según AMOVA).
- 🌲 La diversidad genética debida a la diferenciación entre los individuos entre las poblaciones de *P. tecunumanii* fue baja 6.2% ($G_{ST}=0.062$) y 7.2% ($\Phi_{ST}=0.072$, según AMOVA) o moderada según Wright.
- 🌲 De acuerdo a las relaciones filogenéticas obtenidas por el método de neighbor-joining, las poblaciones de *P. tecunumanii* se dividen en dos grupos: El primero, constituido por Yúcul y Apante; y el segundo, por La Brellera, Monte Carmelo y San Nicolás. El par de poblaciones que presentan menor distancia genética entre sí, fueron La Brellera y Monte Carmelo; mientras las que presentaron mayor distancia genética fueron San Nicolás y Yúcul.



VII

Recomendaciones

Con los resultados obtenidos en el presente estudio de la diversidad genética de las poblaciones naturales de *Pinus tecunumanii* de Nicaragua, mediante el uso de marcadores RAPDs, se recomienda lo siguiente:

- Comparar los resultados obtenidos en este trabajo con RAPD y los generados a partir de AFLP para complementar la información genética de este estudio.

- Muestrear la población de Las Camelias y generar marcadores con los cebadores utilizados en este trabajo y en las mismas condiciones, para incorporar sus resultados a este estudio y completar así la evaluación de la diversidad genética en el total de poblaciones de esta especie en nuestro país.

- Debido a que se detectó un alto grado de polimorfismo en las poblaciones de *P. tecunumanii* y a que la mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones, es necesario su mantenimiento y conservación como unidades separadas y debería esta información constituir una guía para futuros planes de conservación y mejora genética.



VIII

Bibliografya

- ALVAREZ, JB; TOLEDO, MJ; ABELLANAS, B; MARTÍN, LM. 2004. Use of megagametophyte storage proteins as markers of the genetic diversity in stone pine (*Pinus pinea* L.) in Andalucía, Spain. *Genetic Resources and Crop Evolution* 51: 621-627.
- ARANGUREN-MENDEZ, JA; JORDANA, J. 2001. Utilización de marcadores de ADN (microsatélites) en poblaciones de animales domésticos en peligro de extinción (en línea). Consultado 21 Mar 2007. Disponible en:
http://www.avpa.ula.ve/articulos_libres/AVPAconservacion.pdf
- AUDESIRK, T; AUDESIRK, G; BYERS, BE. 2003. *Biología: La vida en la Tierra*. Trad. HJ Escalona; RL Escalona. 6 ed. México, Pearson Educación. 980 p.
- AZOFEIFA-DELGADO, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242.
- BARRENECHE, T; BODENES, C; LEXER, C; TRONTIN, J.-F; FLUCH, S; STREIFF, R; PLOMION, C; ROUSSEL, G; STEINKELLNER, H; BURG, K; FAVRE, J.-M; GLÖSSL, J; KREMER, A. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1090–1103.
- BECERRA, V; PAREDES, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética (en línea). *Agricultura Técnica* 60(3): 270-281. Consultado 15 Abril 2005. Disponible en:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072000000300007&lng=es&nrm=iso
- BIBLIOTECA DE CONSULTA MICROSOFT® ENCARTA® 2002. © 1993-2001 Microsoft Corporation. Reservados todos los derechos.
- BILLINGS, RF; CLARKE, SR; ESPINO MENDOZA, V; CONDÓN CABRERA, P; MELÉNDEZ FIGUEROA, B; CAMPOS, JR; BAEZA, G. 2004. Gorgojo descortezador e incendios: una combinación devastadora para los pinares de América Central. *Unasyuva* 217, Vol. 55, 2004: 15-21.
- BIRD, L; MOLINELLI, J. 2001. *La Biodiversidad*. Consultado 21 sept 2005. Disponible en

- <http://www.alianzageografica.org/leccionbiodiversidad.pdf>
- BLACK, WC. 1998. FORTRAN programs for the analysis of RAPD-PCR markers in populations. Colorado Stat University. Ft. Collins, CO 80523.
- BROWN, WL. 1983. Genetic diversity and genetic vulnerability – an appraisal. *Economical Botany* 37(1):4-12.
- BUCCI, G; VENDRAMIN, GG; LELLI, L ; VICARIO, F. 1997. Assessing the genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered populations: use of molecular markers for conservation purposes. *Theoretical Applied Genetics* 95: 1138-1146.
- BYRNE, M; MURRELL, JC; ALLEN, B; MORAN, GF. 1995. An integrated genetic linkage map for eucalypts using RFLP, RAPD and isozyme markers. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 896–875.
- CENTRO DE MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BANCO DE SEMILLAS FORESTALES (CMG&BSF). 1994. Pinos de Nicaragua. Managua, Nicaragua, Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales (MARENA)/ Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional (DANIDA). 48 p.
- COMISION SECTORIAL DE MEDIO AMBIENTE. 2001. Cartera de Perfiles de Proyectos sobre la base del Plan Estratégico para el Manejo del Gorgojo Descortezador (*Dendroctonus frontalis*, Zimm) y Rescate de la Madera de Pino en el Departamento de Nueva Segovia. Sistema Nacional de Prevención, Mitigación y Atención a Desastres. República de Nicaragua.
- CORNELIUS, J. 1994. Heritabilities and additive genetic coefficients of variation in forest trees. *Canadian Journal of Forest Research* 24: 372–379.
- CURTIS, H; BARNES, NS. 2000. Biología. Ed. A Schnek; G Flores. 6 ed. Argentina, Médica Panamericana. 1491 p.
- DÍAZ, V. 2001. Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de marcadores moleculares. Tesis doctoral. Alcalá de Henares, España, Universidad de Alcalá. 127 p.
- DÍAZ, V; FERRER, E. 2003. Genetic variation of populations of *Pinus oocarpa* revealed by resistance gene analog polymorphism (RGAP). *Genome* 46: 404-410.

- DÍAZ, V; MUÑIZ, LM; FERRER, E. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Molecular Ecology* 10:2593-2603.
- DOLMUS, CM; GARCÍA, IB. 2006. Evaluación de la variabilidad genética de *Pachira quinata* del ensayo de descendencia del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG&BSF), usando marcadores RAPDs. Tesis de licenciatura. León, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 80 p.
- DOYLE, J; DOYLE, J. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12,1:13-15.
- DVORAK, WS; HODGE, GR; ROMERO, JL. 2001. Resultados de veinte años de investigación sobre el *Pinus tecunumanii* por la Cooperativa de CAMCORE. Recursos Genéticos Forestales No. 29. Roma, Italia, FAO.
- ERLICH, HA; GELFAND, D; SNINSKY, J. 1991. Recent Advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643-1650.
- EXCOFFIER, L; LAVAL, G; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- EXCOFFIER, L; SMOUSE, PE; QUATTRO, JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- FAO, CSFD, IPGRI. 2002. Conservación y ordenación de recursos genéticos forestales: en bosques naturales ordenados y áreas protegidas (*in situ*). Instituto Internacional de Recursos Genéticos.
- FARJON, A; STYLES, BT. 1997. *Pinus* (Pinaceae). En: Flora Neotropica. Monograph No. 75. New York, U.S., New York Botanical Garden.
- FELSENSTEIN, J. 2004. PHYLIP ver. 3.65: Phylogeny Inference Package. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington, USA.
- FONTDEVILA, A; MOYA, A. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Madrid, ESP, Síntesis. 349 p.

- FOREST RESOURCES ASSESSMENT (FRA). 2000. Bibliografía comentada: Cambios en la cobertura forestal, Nicaragua (en línea). Roma, ITA, FAO. 51 p. Consultado 23 Mar 2007. Disponible en:
www.fao.org/forestry/webview/media?mediaId=4037&langId=1
- FRANKHAM, R; BALLOU, J; BRISCOE, D. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, United Kindom.
- FULLER, H; CAROTHERS, ZB; PAYNE, WW; BALBACH, MK. 1974. Botánica. Trad. C Gerhard Ottenwaelder. 5 ed. México, Interamericana. 512 p.
- FURMAN, BJ; GRATAPLAGIA, D; DVORAK, WS; O'MALLEY, M. 1997. Analysis of genetic relationships of Centra American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Molecular Ecology* 6: 321-331.
- FUTUYMA, DJ. 1998. Evolutionary Biology. 3 ed. Sunderland, Mass, U.S., Sinauer Associates. 763 p.
- GIBSON, G. L. 1994. Resultados de los Ensayos Internacionales de Procedencias. En: Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG&BSF). 1994. Pinos de Nicaragua. Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales (MARENA)/ Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional (DANIDA). Managua, Nicaragua. 48 p.
- GILLESPIE JUNIOR, A. 1992. *Pinus patula* Schiede and Deppe. Patula pine. SO-ITF-SM-54. New Orleans, LA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 5 p.
- GILLIES, ACM; CORNELIUS, JP; NEWTON, AC; NAVARRO, C; HERNÁNDEZ, M; WILSON, J. 1997 Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPD. *Molecular Ecology* 6: 1133-1145.
- GILLIES, ACM; NAVARRO, C; LOWE, AJ; NEWTON, AC; HERNÁNDEZ, M; WILSON, J; CORNELIUS, JP. 1999. Genetic diversity in Mesoamerican populations of mahogany (*Swietenia macrophylla*), assessed using RAPDs. *Heredity* 38: 722-732.
- GÓMEZ, M; ECHENIQUE, V. 2004. Herramientas básicas de ingeniería genética (en línea). En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. 2004. Biotecnología y

- Mejoramiento Vegetal. Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consultado 23 Mar 2007. Disponible en: www.argenbio.org/h/biblioteca/libropre.php?link=08_II_3.pdf
- GONZÁLEZ, MA; SOSA, P. 2002. La Palmera Canaria (*Phoenix canariensis*): Diversidad Genética e Hibridación. Medio Ambiente CANARIAS N° 23.
- GUIDO, DJ. 2005. Estudio preliminary de la diversidad genética entre 16 procedencias de *Sabal mexicana* Mart, del Pacífico de Nicaragua, aplicando la técnica RAPD. Tesis de Licenciatura. León, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- HAMRICK, JL; GODT, MJW. 1989. Allozyme diversity in plant especies. En: Ed. K Urbanski. Differentiation Patterns in Higher Plantas. NY, U.S., Academic Press.
- HAMRICK, JL; GODT, MJW; SHERMAN-BROYLES, SL. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.
- HARTL, DL. 1987. A Primer of Population Genetics. 2 ed. Sunderland, Mass, U.S., Sinauer Associates.
- HODGE, GR; DVORAK, WS. 1999. Genetics parameters and provenance variation of *Pinus tecunumanii* in 78 international trials. *Forest Genetics* 6(3):157-180.
- HOLLINGSWORTH, PM; ENNOS, RA. 2004. Neighbour joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity* 92: 490-498.
- HUANG, QQ; ZHANG, YX. 2000. Study on the Genetic Structure in *Pinus massoniana* (Masson Pine) Populations. *Silvae Genetica* 49: 190-195.
- HUERTAS, MJ. 2004. Curso Sobre Técnicas En Biotecnología. CNU, UNAN-León, Nicaragua.
- HUFF, DR; PEAKALL, R; SMOUSE, PE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm.]. *Theoretical and Applied Genetics* 86:927-934.
- HURME, P; SAVOLAINEN, O. 1999. Comparison of homology and linkage of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers between individual trees of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) *Molecular Ecology* 8: 15-22
- İÇGEN, Y; KAYA, Z; ÇENGEL, B; VELIOĞLU, E; ÖZTÜRK, H; ÖNDE, SL. 2006.

- Potencial impact of forest management and tree improvement on genetic diversity of Turkish red pine (*Pinus brutia* Ten.) plantations in Turkey. *Forest Ecology and Management* 225: 328-336.
- INSTITUTO NACIONAL FORESTAL (INAFOR). 2002. Proyecto de Control de la Plaga del Gorgojo Ejecutado en Nueva Segovia. INAFOR, Delegación Nueva Segovia, Gobierno de Nicaragua.
- IPGRI; CORNELL UNIVERSITY. 2003a. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (en línea). Consultado 22 Mar 2007. Disponible en:
www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.3.pdf
- IPGRI; CORNELL UNIVERSITY. 2003b. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Sitios de secuencia etiquetada (Microsatélites, SCAR, CAPS, ISSR) (en línea). Consultado 22 Mar 2007. Disponible en:
www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.4.STS.pdf
- JORDE, PE; PALM, S; RYMAN N. 1999. Estimating genetic drift and effective population size from temporal shifts in dominant gene marker frequencies. *Molecular Ecology* 8: 1171-1178.
- KARP, A; EDWARDS, KJ. 1997. DNA markers: a global overview. En: G Caetano-Anollés; PM Gresshoff. DNA markers: Protocols, applications and overviews. New York, US, John Wiley and Sons. pp. 1-13.
- KARP, A; KRESOVICH, S; BHAT, KV; AYAD, WG; HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2.
- KRAFT, T; SÄLL, T. 1999. An evaluation of the use of pooled samples in studies of genetic variation. *Heredity* 82: 488-494.
- KUBISIAK, TL; NELSON, CD; NANCE, WL; STINE, M. 1995. RAPD linkage mapping in a longleaf pine x slash pine F₁ family. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 1119-1127.
- LATTA, RG; MITTON, JB. 1997. A comparison of population differentiation across

- four classes of gene marker in limber pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146:1153-1163.
- LEE, S-W; LEDIG, FT; JOHNSON, DR. 2002. Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus longaeva* (Pinaceae) of the White Mountains, California. *American Journal of Botany* 89(4): 566-577.
- LU, M-Z; SZMIDT, AE; WANG, X-R. 1995. Inherence of RAPD fragments in haploid and diploid tissues of *Pinus sylvestris* (L.). *Heredity* 74: 582-589.
- LYNCH, M; MILLIGAN, BG. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- MANIATIS, TA; FRISCH, EF; SAMBROOK, J. 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, US, Cold Spring Harbor.
- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- MICHAUD, H; TOUMI, L; LUMARET, R; LI, TX; ROMANE, F; DI GUISTO, F. 1995. Effect of geographical discontinuity on genetic variation in *Quercus ilex* L. (holm oak). Evidence from enzyme polymorphism. *Heredity* 74: 590-606.
- MILLAR, CI; MARSHALL, KA. 1992. Allozyme variation of Port-Orford-cedar (*Chamaecyparis lawsonii*): implications for genetic conservation. *Forest Science* 37: 1060-1077.
- MILLER, MP. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) ver 1.3: A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- MONTELEONE, I; FERRAZZINI, D; BELLETTI, P. 2006. Effectiveness of neutral RAPD markers to detect genetic divergence between the subspecies *uncinata* and *mugo* of *Pinus mugo* Turra. *Silva Fennica* 40(3): 391-406.
- MORERA, L; DE ANDRÉS, DF; BARBANCHO, M; GARRIDO, JJ; BARBA, CJ. 1999. Detección de variabilidad genética por microsatélites en el alano español. *Arch. Zootech.* 48:63-70.
- MORITZ, C; HILLIS, DM. 1996. The evolution of molecular systematics. En: Eds. DM Hillis; C Moritz; B K Mable. *Molecular systematics*. 2 ed. Sunderland, Mass, US, Sinauer Associates.

- NAMKOONG, G; KOSHY, MP. 2001. Application of Genetic Markers to Forest tree species. Draft report to IPGRI of the project Developing Decision-making Strategies on Priorities for Conservation and Use of Forest Genetic Resources.
- NEBAUER, SG; DEL CASTILLO-AGUDO, L; SEGURA, J. 1999. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing willow – leaved foxglove (*Digitalis obscura*). *Theoretical Applied Genetics* 98: 985-994.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- NELSON, CD; NANCE, WL; DOUDRICK, RL. 1993. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* Engelm. var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs. *Theoretical Applied Genetics* 87: 145-151.
- NESBITT, KA; POTTS, BM; VAILLANCOURT, RE; REID, JB. 1997. Fingerprinting and pedigree analysis in *Eucalyptus globulus* using RAPD. *Silvae Genetica* 46(1): 6-11.
- NUOVO, GJ. 2001. Co-labeling Using In Situ PCR: A Review. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 49(11): 1329-1339.
- O'BRIEN, IE; SMITH, DR; GARDNER, RC; MURRAY, BG. 1996. Flow cytometric determination of genome size in *Pinus*. *Plant Science* 115: 91-99.
- PAGE, RDM. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.
- PARKER, PG; SNOW, AA; SCHUG, MD, BOOTON, GC; FUERST, PA. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79(2): 361 -382.
- PENG, S-L; LI, Q-F; LI, D; WANG, Z-F; WANG, D-P. 2003. Genetic Diversity of *Pinus massoniana* Revealed by RAPD Markers. *Silvae Genetica* 52(2): 60-63.
- PHILLIPS, W; RODRÍGUEZ, H; FRITZ, P. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie técnica. Informe técnico # 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.

- PICADO, C. 1997. Evaluación de las relaciones genéticas entre y dentro de cuatro cultivares importados de *Jatropha curcas* L.; establecidas en el Banco de Germoplasma de la UNAN-León. Tesis de Licenciatura. León, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- PICCA, A; HELGUERA, M; SALOMÓN, N; CARRERA, A. 2004. Marcadores moleculares (en línea). En: Echenique, V; Rubinstein, C; Mroginski, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Argentina, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consultado 23 Mar 2007. Disponible en: www.argenbio.org/h/biblioteca/libropre.php?link=09_II_4.pdf
- PLOMION, C; BAHRMAN, N; DUREL, CE; O'MALLEY, DM. 1995. Genomic mapping in *Pinus pinaster* (maritime pine) using RAPD and protein markers. *Heredity* 74: 661-668.
- PRIMARCK, R. 1998. *Essentials of Conservation Biology*. 2 ed. Sunderland (Sinauer Associates). Massachusetts, USA.
- PUERTAS, WJ. 1999. *Genética: Fundamentos y perspectivas*. 2 ed. McGraw-Hill, Madrid, ESP. 913 p.
- RAFALSKI, A; MORGANTE, M; POWELL, W; ANDRE, C; VOGEL, JM; TINGEY, SV. 1996. Generating and Using DNA Markers in Plants. In: *Analysis of Nonmammalian Genomes*. Copyright © 1996 by Academic Press, Inc.
- RAMANATHA, RV; HODGKING, T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- RASMUSSEN, SF. 1994. Conservación y aprovechamiento racional de *Pinus patula* ssp. *tecunumanii* en Yúcul. En: Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG&BSF). 1994. Pinos de Nicaragua. Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales (MARENA)/ Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional (DANIDA). Managua, Nicaragua. 48 pp.
- REMINGTON, DL; WHETTEN, RW; LIU, BH; O'MALLEY, DM. 1999. Construcción of an AFLP genetic map with nearly complete genome coverage in *Pinus taeda*. *Theoretical Applied Genetics* 98: 1279-1292.
- REYES, N; RÍOS, A. 2006. Evaluación de la variación somaclonal en cinco

- variedades de *Musa* regeneradas *in vitro* utilizando marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA). Tesis de Licenciatura. León, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.
- REYNOLDS, J; WEIR, BS; COCKERHAM, CC. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for short term genetic distance. *Genetics*, 105: 767-779.
- ROHLF, FJ. 2005. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.20. Exeter Software. New York.
- SAITOU, N; NEI, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SNEATH, PHA; SOKAL, RR. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classifications. San Francisco, US, Freeman.
- SPOONER, D, VAN TREUREN, R; DE VICENTE, MC. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI Technical Bulletin No. 10.
- STEVENS, WD. 2001. Flora de Nicaragua. St. Louis, Missouri: Missouri Botanical Garden Press. Disponible en:
<http://www.mobot.org/MOBOT/research/nicaragua/welcome.shtml>
- STYLES, BT. 1994. El Género Pinus en Nicaragua. En: Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG&BSF). 1994. Pinos de Nicaragua. Ministerio del Ambiente y Recursos Naturales (MARENA)/ Agencia Danesa para el Desarrollo Internacional (DANIDA). Managua, Nicaragua. 48 pp.
- SURZYCKI, S. 2002. Basic Techniques in Molecular Cloning. Londres, ING, Springer.
- SZMIDT, AE; WANG, X-R; LU, M-Z. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412-420.
- THOMAS, BR; MACDONALD, SE; HICKS, M; ADAMS, DL; HODGETTS, RB. 1999. Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 793-801.
- TINGEY, SV; DEL TUFO, JP. 1993. Genetic Analysis with Random Amplified

- Polymorphic DNA Markers. *Plant Physiology* 101: 349-352.
- TONON, A; RUIZ, M; OTEGUI, M. 2002. Utilidad de los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de Especies Forestales. *Novenas Jornadas Técnicas Forestales. INTA-FCF-MEYRNRYT-Eldorado, Misiones, Argentina*
- TORRES, E; IRIONDO, JM; PÉREZ, C. 2003. Genetic structure of a endangered plant, *Antirrhinum microphyllum* (Scrophulariaceae): allozyme and RAPD analysis. *American Journal of Botany* 90: 85-92.
- TRAVIS, SE; RITLAND, K; WHITHAM, TG; KEIM, P. 1998. A genetic linkage map of pinyon pine (*Pinus edulis*) based on amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical Applied Genetics* 97: 871-880.
- VAN ROSSUM, F; VEKEMANS, X; MEERTS, P; GRATIA, E; LEFÈBVRE, C. 1997. Allozyme variation in relation to ecotypic differentiation and population size in marginal populations of *Silene nutans*. *Heredity*, 78: 552-560.
- VAXEVANIDOU, Z; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, SC; CLIMENT, J; GIL, L. 2006. Tree populations bordering on extinction: A case study in the endemic Canary Island pine. *Biological Conservation* 129: 451-460.
- VOS, P; HOGERS, R; BLEEKER, M; REIJANS, M; VAN DE LEE, T; HORNES, M; FRIJTERS, A; POT, J; PELEMAN, J; KUIPER, M; ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23(21): 4407-4414.
- WATSON, JD; GILMAN, M; WITKOWSKI, J; ZOLLER, M. 1991. *Recombinant DNA*. 2 ed. USA, Scientific American Books. 619 p.
- WAUGH, R; POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *TIBTECH* 10: 186-191.
- WILLIAMS, JGK; KUBELIK, AR; LIVAK, KJ; RAFALSKI, JA; TINGEY, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22): 6531-6535.
- WILLIAMS, L; RAMOS, E. 2000. Uso de marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivares de *Jatropha curcas* L. Monografía, Licenciatura. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua.

- WRIGHT, S. 1978. Evolution and genetics of population. Vol. 4. Variability within and among populations. Chicag, US, University of Chicago Press. III.
- WU, J; KRUTOVSKII, K; STRAUSS, SH. 1999. Nuclear DNA diversity, population differentiation, and phylogenetic relationships in the California close-pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome* 42: 893-908.
- ZHIVOTOVSKY, LA. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.
- ZHANG, Z-, CHEN, Y-Y; LI, D-Z. 2005. Detection of Low Genetic Variation in a Critically Endangered Chinese Pine, *Pinus squamata*, Using RAPD and ISSR Markers. *Biochemical genetics* 43 (5/6): 239-249.

GLOSARIO

A

Acícula Hoja linear, en forma de aguja, de los árboles y arbustos de coníferas.

Acúleo. Agujón

AFLP. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados. Es un método muy sensible para detectar polimorfismos del ADN. Primero se somete el ADN a digestión con dos enzimas de restricción; luego se selecciona un subconjunto de los fragmentos de ADN que resultan de la digestión para que sean amplificados en la PCR y, finalmente, visualizados.

Alelo. Es una de varias formas alternativas de un gen que ocupa el mismo locus en un cromosoma particular.

Alogamia. La transferencia del polen (es decir, la polinización) desde la antera de la flor de una planta al estigma de la flor de una planta genéticamente diferente.

Análisis molecular de varianza (AMOVA). El análisis de la varianza molecular es un método para estudiar la variación molecular dentro de una especie. Corresponde a un análisis estadístico que estima valores F (coeficientes de varianza), para determinar la probabilidad que las diferencias entre poblaciones o tratamientos son demasiado grandes como para ser debidas al azar.

Apófisis. Protuberancia apical y expuesta de forma variable de las escamas seminíferas de los estróbilos de las coníferas.

Aptitud. En genética clásica es la habilidad de un individuo o población para sobrevivir y reproducirse en un ambiente particular.

Aptitud adaptativa o evolutiva. Es la habilidad de una población para sobrevivir, reproducirse y adaptarse genéticamente a los cambios ambientales por al menos un número relativamente pequeño de generaciones (<50). (Ver acervo genético y heterocigosidad).

Árbol plus. Un árbol sancionado como fenotípicamente superior, pero no probado genéticamente.

Arquegonio. En los briofitos y algunas plantas vasculares, el órgano multicelular productor de ovocélulas u oosferas.

Autofecundación. Fertilizar a través del polen de la misma planta.

Autogamia. 1. Transferencia del polen (polinización) desde la antera de una flor al estigma de la misma flor o, a veces, al de una flor genéticamente idéntica (o sea, de la misma planta o del mismo clon). 2. La habilidad que tienen muchas especies vegetales de lograr con éxito la fertilización natural de ellas mismas.

Autopolinización. Ver Autogamia

B

Biodiversidad. La totalidad de genes, especies y ecosistemas en una región dada, sea ésta un microhábitat o el mundo.

Bootstrapping. Es un método de remuestreo con reemplazo, con la misma matriz de datos. Permite el cálculo de las desviaciones estándar y

varianzas, y es útil para aquellas situaciones en las cuales el número de muestras o los recursos (por ejemplo, el tiempo, el presupuesto) son limitados.

Bráctea. Órgano foliáceo en la proximidad de las flores y diferente a las hojas normales y las piezas del perianto.

C

Carácter o rasgo. Una propiedad de todo o de una parte del fenotipo que puede presentar varios estados determinados genéticamente, al menos en parte.

Cebador. Secuencias flanqueadas de ADN, usados en la PCR para iniciar la amplificación.

Coefficiente de correlación cofenético. Es una medida de que tan bien un árbol representa en dos dimensiones las relaciones multidimensionales dentro de los datos entrantes.

Conífera. Árboles o arbustos resinosos monopódicos, su raíz carece de pelos absorbentes sustituidos por micorrizas, sus flores son unisexuales y el fruto es una piña lignificada.

Conservación. Práctica y método que se aplica para la perpetuación de la pureza genética.

Conservación in situ. Es un método de conservación que pretende preservar la integridad genética de los recursos genéticos manteniéndolos dentro de los ecosistemas en evolución dinámica del hábitat original o del ambiente natural.

Cruzamiento exogámico. Cruzamiento controlado o natural, entre individuos no

emparentados. Puede también referirse a una especie que tiene una barrera para la autofertilización, o exhibir tal nivel de depresión endogámica que los individuos consanguíneos nunca alcancen la madurez.

Cuello de botella poblacional. Episodio de disminución del tamaño de una población que genera pérdida de variabilidad debido a deriva.

D

Depresión endogámica. La reducción del vigor observada en la progenie de cruzamiento entre pariente cercanos. La depresión endogámica es debida a la expresión de alelos recesivos perjudiciales y es severa en especies exogámicas de polinización abierta.

Deriva genética. Cambios en la frecuencia de genes o pérdida de genes en una población pequeña debido a efectos aleatorios. Comúnmente corresponde a una pérdida de alelos raros.

Diploide. Una dotación completa de material genético, que consta de pares de cromosomas, cada uno proveniente de un progenitor. La mayoría de las células animales, excepto el gameto, tienen una dotación diploide de cromosomas.

Distancia genética. Una medida de la diferencia genética entre frecuencias de alelos en dos poblaciones.

Diversidad genética. Una medida de la variabilidad que representa la probabilidad de que dos nucleótidos, haplotipos, fragmentos de restricción o electromorfos sean distintos en una muestra de una población. Coincide con la

heterocigosis esperada en una población de un organismo diploide de apareamiento al azar.

Dominancia. En genética mendeliana clásica, es el enmascaramiento de la acción de un alelo por otro.

Duramen. Parte más seca, fuerte y oscura, de la madera de un árbol.

E

Electroforesis en gel. Técnica en la que se colocan moléculas (como fragmentos de ADN por ejemplo) en pistas restringidas de una lámina fina de material gelatinoso y se exponen a un campo eléctrico; las moléculas migran con una rapidez que está determinada por ciertas características, como la longitud, por ejemplo.

Endémica. Respecto a filogenética, se refiere a planta, población o especie nativa o propia de una región o medio ambiente particular.

Endogamia. Cruzamiento entre individuos íntimamente emparentados lo que favorece a la homocigosis, que en algunos casos es perjudicial porque pueden presentarse efectos detrimentales, letales, subletales o deletéreos en algunos caracteres.

Equilibrio Hardy-Weinberg. Estado de una población panmíctica, sometida exclusivamente a las leyes de la transmisión mendeliana, en que las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes.

Espora. Célula reproductiva asexual o célula en reposo capaz de desarrollar un organismo nuevo sin fusionarse con otra célula.

Esporangio. Estructura unicelular o multicelular en la cual se producen las esporas.

Esporofito. En los organismos que tienen alternancia de una generación haploide con una diploide (todas las plantas y algunas algas verdes); la generación diploide ($2n$), productora de esporas.

Estructura genética. Se entiende como estructura genética de una especie a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de dicha especie.

Evolución. Cambio en la constitución genética de las poblaciones, a lo largo de las generaciones.

Exfoliante. Dividir en hojas, láminas o escamas.

F

Fascículo. Hacedillo, agrupamiento condensado o cerrado, como de flores.

Fenotipo. Carácter expresado en los individuos como resultado de la interacción genotipo medio ambiente; o sea, la presencia visual u objetiva que es susceptible de apreciación y de evaluación; o sea un caracteres cualitativos o en cuantitativos.

Filogenia: Historia evolutiva de una especie. Un diagrama que ilustra la historia evolutiva deducida de las poblaciones de organismos relacionados.

Fitness adaptativo. Véase Aptitud adaptativa.

Flujo de genes. El movimiento de alelos específicos entre diferentes poblaciones de una especie o entre especies relacionadas.

Fuste. En los árboles, el tallo o tronco robusto y recto, de su base hasta las primeras

ramificaciones; término de uso común por los forestales.

G

Gametofito. En los organismos que tienen alternancia de generaciones haploides y diploides (todas las plantas y algunas algas verdes), la generación haploide (n) que produce gametos.

Gen. Región del ADN que controla una característica hereditaria discreta, usualmente correspondiente a una sola proteína o ARN.

Genética. La genética es la ciencia básica relacionada con el estudio de las causas de la semejanza y diferencias entre organismos, relacionada a través de la descendencia. Esta toma en cuenta los efectos de los genes y el ambiente.

Genética de poblaciones: El estudio cuantitativo y la medida de las poblaciones en términos estadísticos; por ejemplo, el estudio de los fenómenos genéticos en función de parámetros estadísticos estándar como cuadros y distribuciones de frecuencia, medias, varianza y desviaciones estándar.

Genotipo. Constitución genética de una célula individual u organismo.

Gimnosperma. Dícese de plantas fanerógamas cuyos carpelos no llegan a constituir una cavidad cerrada y por tanto, las semillas quedan al descubierto.

H

Haploide. Una dotación sencilla de cromosomas (la mitad de la serie completa de material genético) presente en cada óvulo y célula espermática de los animales y en cada óvulo y célula polínica de las plantas.

Herencia. Mecanismos propuestos por Mendel que postula que los factores hereditarios están en los cromosomas y mantienen su individualidad generación tras generación, combinándose en el cigoto según las reglas de la probabilidad y permitiendo el mantenimiento de la variedad genética.

Heredabilidad. Grado en que una progenie se asemeja a sus progenitores. Un coeficiente entre los factores genéticos y totales (genéticos y ambientales) que influyen en la expresión de un rasgo.

Heterocigoto. Portador de dos alelos diferentes en un locus. Cuando es usado para referirse al genotipo total, indica que los individuos tienen diferentes alelos en muchos locos. Cuando es usado para referirse a una especie, se dice que tiene baja o alta heterocigocidad con respecto a otra para indicar que la especie tiene un número relativamente alto de loci variables.

Homocigoto. Portador de dos alelos idénticos en un locus, en muchos locos, o en la especie entera.

I

Índice de fijación (F_{ST}). Proporción relativa de varianza génica entre poblaciones. Indica el estado en que se encuentra un proceso de fijación génica por deriva.

Isoenzima (isozima). Cada una de las formas moleculares diferentes de una misma enzima.

L

Locus. La posición de un gen en un cromosoma.

M

Marcador molecular. Un alelo, una banda en un gel o un carácter que sirve experimentalmente como sonda para identificar a un individuo o a alguna de sus características.

Matriz cofenética es una matriz que codifica las relaciones de similitud entre un grupo de objetos como definidos por la salida de una clasificación hierarchial, un árbol.

Megaspora. En las plantas, espora haploide (n) que da origen a un gametofito femenino.

Meiosis. Las dos divisiones nucleares sucesivas durante las cuales una sola célula diploide ($2n$) forma cuatro núcleos haploides (n). En la meiosis ocurre la recombinación genética debida al entrecruzamiento y la segregación al azar de los cromosomas; como resultado de la meiosis pueden producirse gametos o esporas.

Mejoramiento genético. La propagación y manipulación genética mediante la hibridación o la autogamia deliberada de plantas, para seleccionar progenie mejorada.

Microspora. En las plantas, una espora haploide (n) que da origen al gametofito

masculino; en las plantas con semilla se transforma en un grano de polen.

Mutación. Cambio heredable en la secuencia de un nucleótido de un cromosoma.

P

Papirácea. De la consistencia y delgadez del papel.

PCR. Técnica para la amplificación de regiones específicas de ADN por el uso de cebadores de secuencia específica y ciclos múltiples de síntesis de ADN, cada ciclo es seguido por un corto tratamiento de calor para separar hebras complementarias.

Permutación. Es un reordenamiento de una colección de objetos. También se usa el término permutaciones (o variaciones) para referirse al número de diferentes ordenamientos.

Población. Conjunto de individuos de una misma especie que se cruzan entre sí libremente.

Población panmíctica. Aquella población en que sus miembros se aparean al azar.

Polimorfismo. Porcentaje de loci variables. Se establece que un locus es polimórfico si el alelo más frecuente no supera el 95% (o el 99% queremos ser más restrictivos).

Poza génica. La suma total de toda la variación genética en la población de mejoramiento de una especie y especies estrechamente relacionadas capaces de cruzarse con ella.

Pruinoso. Revestimiento ceroso tenue de aspecto glauco o blanquecino. Que tiene una pelusilla cérea (o pruina) en la superficie.

R

RAPD. Polimorfismo del ADN amplificado al azar. Técnica que amplifica tramos anónimos de ADN, empleando la PCR con cebadores arbitrarios.

Reservorio génico. Véase Poza génica.

S

Selección natural. Proceso que favorece la reproducción de los organismos más aptos en una población, por lo que éstos transmiten sus genes con más probabilidad que los demás a la siguiente generación. Este proceso conduce a cambios génicos de valor evolutivo.

Sésil. Que carece de pie o soporte. Sentado, no pedicelado.

Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (En inglés Universal Transverse Mercator, **UTM**). Es un sistema de coordenadas basado en la proyección geográfica transversa de Mercator, que se construye como la proyección de Mercator normal, pero en vez de hacerla tangente al Ecuador, se la hace tangente a un meridiano. A diferencia del sistema de coordenadas tradicional, expresadas en longitud y latitud, las magnitudes en el sistema **UTM** se expresan en metros.

T

Tampón. Es una sustancia o mezcla de sustancias que consiguen mantener estable el pH, a pesar de añadirle ácidos o álcalis.

V

Valor adaptativo. Propiedad de un carácter que contribuye a la supervivencia de un organismo.

Variabilidad genética. Es la variación en la composición genética de los individuos dentro de la especie o entre especies diferentes; es la variación genética hereditaria dentro de las poblaciones y entre ellas.

Viabilidad poblacional. Es la habilidad de una población para vivir, crecer y desarrollarse. Esto es afectado por los factores de hábitat físico (clima, geología, topografía, y factores de drenaje) y factores de hábitat biótico (plantas, poblaciones animales y comunidades).