

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua
UNAN-León

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Calycophyllum candidissimum* (Vahl) DC en la región del Pacífico de Nicaragua con la técnica RAPD

Autor:

Br. Carmen María Olivares Cruz
Br. Ingrid Nereyda González Serrano

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

Tutor:

Ph.D. María Verónica Díaz

LEÓN, NICARAGUA, C. A.

2012

Dedicatoria

Carmen

A Dios por regalarme el don de la vida y con ella, la oportunidad de llegar hasta este momento tan anhelado; a mis padres: Leonel Olivares y Carmen Cruz por ser mi brújula a seguir y mi apoyo incondicional a lo largo de mis estudios; a mi tutora, Verónica Díaz por su tolerancia, ayuda y comprensión durante el tiempo de realización de este trabajo.

Ingrid

A Dios por darme el don de la vida.

A mi padres Julián González y Norma Serrano por ser la columna en mi formación, gracias por todos sus sacrificios a lo largo de mi carrera.

A mis hermanas Oneyda, Norma y Serenia por su apoyo y espíritu de ánimo.

A mi esposo Eduardo Lanzas por sus consejos, favores y paciencia.

En especial a mi hijo David Eduardo por ser mi inspiración a seguir superándome.

A mi tutora Verónica Díaz por confiar en mí; gracias por darme esta oportunidad.

Agradecimiento

Este trabajo se realizó gracias al financiamiento aportado por **PRORURAL** a través del Instituto Nacional Forestal (INAFOR) y el Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semilla Forestal (CMG&BSF), así como por la Cooperación Española a través del hermanamiento UNAN–LEÓN – Universidad de Alcalá de Henares con el fortalecimiento en equipos al Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología.

A nuestra tutora **Dra. Verónica Díaz** queremos expresarle nuestro mayor agradecimiento por darnos la oportunidad de realizar este estudio y por su dedicación y constancia durante el tiempo de realización de este trabajo, ya que sin su ayuda no hubiese sido posible cumplir con este último paso que es muy importante para nosotras.

También queremos agradecer de manera muy especial al **Lic. Rolando Dolmus** por habernos proporcionado la valiosa información sobre la ubicación de las poblaciones de madroño en Nicaragua. **AMSc. Lourdes Callejas** por su atención y amabilidad al estar siempre dispuesta a aclarar nuestras dudas en momentos que se lo solicitamos.

A dos personas que también aportaron con su ayuda y que fue de mucha importancia para este estudio al **Lic. David Alberto Cerda Granados** por habernos sacado de apuros en la realización del dendrograma, a **Eduardo Noel Mendoza Ramírez**, por su gran ayuda en la elaboración del mapa sobre la distribución de madroño en Nicaragua.

A las personas que fueron parte del equipo de colecta: **Lic. Marcos Campos Úbeda**, **Lic. María Altamirano Tinoco**, **José López Hernández** y **Walter Soza**, porque su ayuda fue de gran importancia en cada viaje de campo para la colecta de las muestras.

¡Muchas Gracias a todos.....!

ÍNDICE

Lista de figuras	vii
Lista de abreviaturas.....	viii
RESUMEN	ix
I- INTRODUCCIÓN	1
II- OBJETIVOS	3
III - MARCO TEÓRICO	4
3.1. Generalidades de <i>Calycophyllum candidissimum</i>	4
3.1.1. Sinónimos y nombres comunes	4
3.1.2. Descripción general de <i>C. candidissimum</i> (Vahl) DC.....	4
3.1.3. Ecología	5
3.1.4 Distribución.	5
3.1.5. Disposición gubernamental sobre <i>C. candidissimum</i> en Nicaragua.....	5
3.1.6. Usos de <i>C. candidissimum</i>	6
3.2. Bosques tropicales y cambio climático.....	6
3.3. Biología reproductiva de especies tropicales	10
3.3.1. Aspectos generales de la Biología Reproductiva.....	10
3.3.2. Biología reproductiva de la familia Rubiácea	12
3.4. Importancia de la conservación de los recursos genéticos	12
3.5. Genética de poblaciones y evolución	15
3.6. Diversidad genética	15
3.6.1. Causas de la diversidad genética.....	16
La mutación	16
Recombinación sexual.....	17
La migración o flujo de genes.....	17
Híbridos	18
Heterocigosis y vigor	18
La selección	18
3.6.2. Pérdida de la diversidad genética	19
La endogamia	19
Los cuellos de botella	20
Deriva genética.....	20

3.6.3. Estructura de las poblaciones	21
3.7. Genética forestal.....	22
3.8. Mejoramiento genético.....	22
3.9. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales	23
3.9.1 Generalidades de la extracción de ADN vegetal	23
3.9.2. Pasos generales para extraer y purificar ADN.....	24
3.9.2.1. Funciones de soluciones en el proceso de extracción de ADN.....	26
3.9.3. Marcadores Moleculares.....	28
3.9.4 Importancia de los marcadores de ADN	29
3.9.5. Tipos de marcadores	31
3.9.5.1. Marcadores morfológicos	31
3.9.5.2. Marcadores bioquímicos.....	31
3.9.5.3. Marcadores de ADN	32
3.9.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	34
3.9.7. ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD).....	36
3.9.8. Usos de la Biotecnología en los Recursos Genéticos Forestales.....	38
IV- MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
4.1 Material vegetal.....	41
4.2. Extracción de ADN	42
4.3. Chequeo, cuantificación y dilución de ADN extraído	43
4.4. Amplificaciones RAPDs	44
4.4.1. Chequeo de amplificación.....	45
4.5. Análisis de datos.....	46
V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
5.1. Condiciones actuales de las poblaciones muestreadas de <i>C. candidissimum</i> de Nicaragua.	47
5.2. Extracción de ADN	49
5.2.1. Análisis de Patrones de bandas.....	50
5.3. Relaciones filogenéticos entre las poblaciones de <i>C. candidissimum</i>	57
VI- CONCLUSIONES	61
VII- RECOMENDACIONES	62
VIII- BIBLIOGRAFÍA	63
ANEXOS	73

Lista de tablas

Tabla 1. Sexualidad floral en el bosque tropical húmedo de la región de La Selva	11
Tabla 2. Algunos agentes contaminantes en preparaciones de ADN (basado en Sambrook <i>et al.</i> , 2001; Taylor <i>et al.</i> , 1993; Rogers y Bendich 1988).	28
Tabla 3. Comparación entre marcadores morfológicos y moleculares	34
Tabla 4. Información de la cantidad y procedencia de las muestras de <i>C. candidissimum</i> (Vahl) DC.	42
Tabla 5. Distancia Geográfica (km) entre las poblaciones muestreadas de <i>C. candidissimum</i> (Vahl) DC.	42
Tabla 6. Secuencia de ocho cebadores seleccionados para el estudio total de las 117 muestras de <i>C. candidissimum</i> (Vahl) DC. con la técnica RAPD.	46
Tabla 7. Medidas morfológicas de los árboles colectados de <i>C. candidissimum</i> , correspondientes a las seis poblaciones muestreadas.	48
Tabla 8. Cebadores utilizados, número total de bandas, número de bandas polimórficas y monomórficas.	51
Tabla 9. Tamaño de bandas obtenidas (rango en pb) con los cebadores seleccionados.	51
Tabla 10. Número de bandas y porcentaje (entre paréntesis) de polimorfismo de cada población en estudio con el conjunto de cebadores.	56

Lista de figuras

Figura 1. Árbol de <i>Calycophyllum candidissimum</i>	73
Figura 2. Comparación de la corteza de <i>Calycophyllum candidissimum</i> en estado joven (a) y estado adulto (b).....	74
Figura 3. a) Inflorescencia y b) flor individual c) hojas de <i>C. candidissimum</i>	74
Figura 4. a) fruto verde, b) cápsula seca y c) las semillas secas de <i>C. candidissimum</i>	75
Figura 5. Distribución potencial de <i>Calycophyllum candidissimum</i>	5
Figura 6. Ubicación de poblaciones muestreadas de <i>Calycophyllum candidissimum</i> (Vahl) DC. en Nicaragua.....	49
Figura 7. Deshidratación de las hojas de <i>Calycophyllum candidissimum</i> con sílica gel.	75
Figura 8. ADN de <i>Calycophyllum candidissimum</i> extraído en el Laboratorio de Genética Molecular UNAN-León en muestras de la población de El Sauce.	50
Figura 9. Productos de amplificación RAPDs con el cebador T-08, población Mina El Limón.....	53
Figura 10. Productos de amplificación RAPDs con el cebador S-02, en la población de León.....	53
Figura 11. Diversidad genética de las poblaciones de <i>C. candidissimum</i>	55
Figura 12. Dendrograma de <i>Neighbor- Joining</i> mostrando las distancias genéticas de seis poblaciones de <i>C. candidissimum</i> de Nicaragua utilizando marcadores RAPDs. a escala indica una distancia genética de 0.1.....	60

Lista de abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AFLP	Polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados.
ARN	Ácido ribonucleico
CATIE	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CMG & BSF	Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales
CSFD	Comité Científico Francés de la Desertificación
CTAB	Bromuro trimetil amonio de acetilo
DAP	Diámetro a la altura del pecho.
dNTP	2'-deoxinucleósido 5'trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
GIS	Sistema de Información Geográfica
INAFOR	Instituto Nacional Forestal
IPGRI	Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
ISSR	Inter-simple sequencerepets
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
Pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PROCYMAF	Programa de Desarrollo Forestal Comunitario
PVP	Polivinilpirrolidona
QTL	Loci de caracteres cuantitativos
RAPD	Amplificación al azar del ADN polimórfico
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEMARNAT	Secretaría de medio ambiente y recursos naturales
SSR	Repeticiones de secuencias simples
TAE	Tris acetato EDTA
TE	Tris EDTA
UV	Ultravioleta
µg	Microgramo
µl	Microlitro.

RESUMEN

El madroño, pertenece a la familia Rubiácea y se constituye como el Árbol Nacional de Nicaragua por el decreto N° 194 publicado en LaGaceta en 1971. Su principal uso como leña y carbón, ha reducido drásticamente el tamaño de las poblaciones y ha implicado la disminución de su diversidad genética. La pérdida o baja diversidad genética en las especies está relacionada con los efectos deletéreos de la endogamia sobre la reproducción y sobrevivencia (depresión de endogamia). Dado que no existen antecedentes de estudios de esta naturaleza en madroño, no se conoce la situación actual de la cantidad y distribución de su diversidad genética, y por ende, de su capacidad para responder a las presiones que se ejercen sobre éstos. Con este estudio se pretende evaluar por medio de marcadores RAPD la estructura genética de estas poblaciones, lo que permitiría ubicar las poblaciones que contengan la suficiente diversidad genética para ineludibles programas de conservación *in situ* y mejora genética; ya que esta especie tiene un alto valor intrínseco por su importancia como fuente de combustible para los sectores más pobres y por su valor emblemático como árbol nacional. El estudio se realizó con 117 individuos correspondientes a 6 poblaciones: Volcán Cosigüina, en Chinandega; Refugio de Vida Silvestre La Flor, en Rivas; Volcán Momotombo, El Sauce, Mina El Limón y León; en León. La técnica RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) fue aplicada en los 8 cebadores seleccionados. Estos produjeron un total de 83 bandas, de las cuales 28 resultaron monomórficas y 55 polimórficas. Las poblaciones que presentaron mayor porcentaje de polimorfismo o diversidad genética fueron: El Sauce con 62.65%, Cosigüina con 60.24% y Mina el Limón con 59.04% seguidas de La Flor y León, ambas con un 57.83% y Momotombo con 50.60%. Al relacionar las seis poblaciones de acuerdo a las distancias geográficas y genéticas, tres poblaciones más cercanas geográficamente. El Sauce, Momotombo y Mina El Limón, también presentan las menores distancias genéticas entre ellas, formando un solo grupo. En cambio, las otras tres poblaciones que se encuentran más distantes geográficamente: León, Cosigüina y La Flor forman otro grupo, pero no presentan correspondencia entre las distancias geográficas y las genéticas. La distribución en el dendrograma de todas las poblaciones estudiadas refleja la baja diferenciación genética entre éstas, puesto que se observan valores similares de distancias genéticas entre las mismas, siendo un poco mayor la distancia de la rama que separa los dos grupos formados. La falta de diferenciación puede deberse a que hasta hace poco era una sola población. Sugiriendo que la fragmentación de la población es reciente lo que no ha permitido procesos de deriva genética.

I- INTRODUCCIÓN

Calycophyllum candidissimum (Vahl) DC, denominado en Nicaragua como madroño, es un árbol de la familia Rubiaceae y se constituye como el Árbol Nacional de Nicaragua por el decreto N° 194 publicado en La Gaceta en 1971. El madroño ha formado parte de las tradiciones nicaragüenses, y sus flores fragantes y ramas son utilizadas como ornamentales para adornar los altares de La Purísima Concepción de María, celebración religiosa popular desde la época de la colonia, (Cordero, 2003). En Centroamérica también es muy codiciada para leña y carbón, que es su principal valor comercial. Se puede encontrar en linderos y cercas vivas, en algunos casos en asociaciones agroforestales.

En Nicaragua, debido a su principal uso como leña y carbón, se ha dado una sobreexplotación de esta especie, lo que ha reducido el tamaño de las poblaciones e implicado la disminución de su diversidad genética. La variación genética a nivel de las especies y poblaciones, es importante porque es lo que permite la evolución y adaptación de las especies a los cambios del medio ambiente, incluido el cambio climático. La pérdida o baja diversidad genética en las especies está relacionada con los efectos deletéreos de la endogamia sobre la reproducción y sobrevivencia (depresión de endogamia).

La FAO (2008) considera que la variación genética es esencial porque en base a ella, la selección y la mejora genética pueden satisfacer las necesidades actuales y futuras de la humanidad y por lo tanto, reconoce que la conservación de los recursos genéticos es vital, ya que son recursos únicos e irremplazables para el futuro. De lo contrario, no se podrá satisfacer la creciente demanda interna de leña, energía, alimentos y servicios medioambientales.

En las especies forestales se han dificultado los estudios genéticos por los largos ciclos de vida de estas especies. Pero debido a la rápida evolución en el campo de la genética molecular, una variedad de técnicas ha surgido para

analizar la variación genética en los últimos decenios. Los denominados marcadores genéticos pueden variar con respecto a características importantes, como su abundancia en el genoma, el nivel de polimorfismo detectado, la especificidad de locus, la reproducibilidad, los requisitos técnicos y el costo económico (Spooner *et al.*, 2005).

De las diferentes técnicas moleculares, la más utilizada en estudios de evaluación de diversidad genética en poblaciones naturales es el análisis RAPD (amplificación al azar del ADN polimórfico) (Williams *et al.*, 1990), en la que se utiliza un único cebador corto dirigido al azar en el genoma a estudiar y los productos de amplificación son separados en geles de agarosa observándose múltiples bandas en presencia de bromuro de etidio y luz UV, detectándose así la diversidad presente en las poblaciones.

Dado que no existen antecedentes de estudios genéticos en madroño, no se conoce la situación actual de la estructura genética de sus poblaciones y por lo tanto su capacidad para responder a las presiones que se ejercen sobre estas; ya que es una especie muy codiciada para leña. Con este estudio se pretende evaluar por medio de marcadores RAPD la cantidad y distribución de la diversidad genética de estas poblaciones, lo que permitiría ubicar las poblaciones que contengan la suficiente diversidad genética para incluir en programas de conservación *in situ* y manejo para un aprovechamiento sustentable; identificando las mejores procedencias como fuentes semilleros para proyectos de conservación, reforestación, manejo de plantaciones comerciales y mejora genética, así como para determinar si cada población muestreada evoluciona independientemente o están conectadas por flujo de genes.

II- OBJETIVOS

Objetivo general:

- Evaluar la diversidad genética de poblaciones naturales de *C.candidissimum* por medio de marcadores RAPDs.

Objetivos específicos:

- Determinar la diversidad genética dentro de cada población basada en el porcentaje de polimorfismo.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las poblaciones en base a la distancia genética entre ellas.

III - MARCO TEÓRICO

3.1. Generalidades de *Calycophyllum candidissimum*

C. candidissimum pertenece a la familia Rubiaceae, es una gran familia que reúne unas 6,000 especies distribuidas por toda la Tierra, aunque tiene su máxima expresión en los trópicos, donde está representada, sobre todo, por plantas leñosas (Stevens *et al.*, 2001).

3.1.1. Sinónimos y nombres comunes

Macrocneum candidissimum Vahl.

Sálamo, madroño, urraco, alazano, harino, surra (América Central); camarón, palo colorado, chacalí (México); dagame (Cuba); guayabo joberoso, guayabo colorado (Colombia); araguato, betún (Venezuela); Lenmonwood (E.E.U.U) (CATIE, 1998).

3.1.2. Descripción general de *C. candidissimum* (Vahl) DC

Son árboles con alturas hasta 20 m (**figura 1 anexos**); de corteza exfoliante en placas dejando un tronco variegado con castaño, blanco y a veces verde; (**figura 2 anexos**). Sus hojas son opuestas, elípticas con ápice acuminado, base cuneada y atenuada. Son plantas hermafroditas con inflorescencias terminales de formas paniculadas, redondeadas de color blanco verdosa (**figura 3 anexos**).

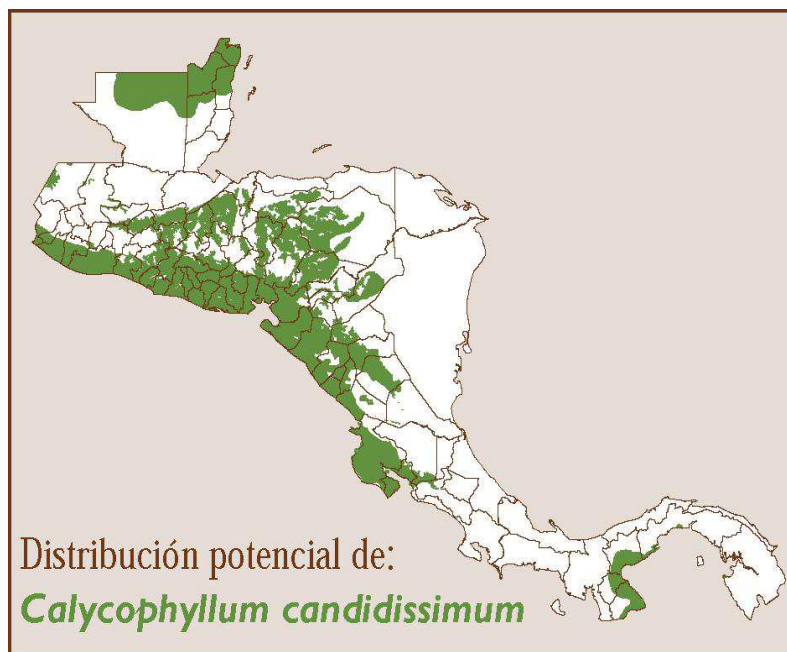
Presenta frutos muy pequeños en forma de cápsulas septicidas, cilíndricas de aspecto leñosas con semillas aladas, aplanadas, fusiformes (**figura 4 anexos**).

Florece de septiembre a enero.

Fructifica de enero a abril.

3.1.3. Ecología: Frecuente en bosques estacionales y sembrada en cercos por todo el país. Se le encuentra a altitudes desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm; con temperaturas medias superiores a los 26°C. Se adapta a una gran variedad de suelos, desde calcáreos con buen drenaje hasta arcillosos mal drenados.

3.1.4 Distribución: Desde el sur de México, América Central y las Antillas hasta Colombia y Venezuela (Stevens *et al.*, 2001) (ver figura 5).



Fuente: Cordero y Boshier, 2003.

Figura 5. Distribución potencial de *C.candidissimum*.

3.1.5. Disposición gubernamental sobre *C. candidissimum* en Nicaragua

C.candidissimum fue denominado Árbol Nacional de Nicaragua en La Gaceta, Diario Oficial no.194 del 27 agosto de 1971. El Poder Ejecutivo de Nicaragua, a través de los Ministerios de Agricultura y de Educación Pública, dispondrá que ese árbol sea sembrado en los parques, aceras y autopistas de todo el país, y en el Día del Árbol, en cada Centro de Enseñanza.

3.1.6. Usos de *C.candidissimum*

Según Cordero (2003), el principal uso del madroño en Nicaragua, al igual que en el resto de países de Centroamérica, es para leña y carbón por sus excepcionales cualidades para estos fines. En Choluteca, Honduras, se usa en construcción para horcones, por su rectitud. También se utiliza en carpintería y ebanistería (marcos de puertas y ventanas), pisos de lujo, cabos y mangos de herramientas agrícolas. Además, la madera se exporta hacia los Estados Unidos para la fabricación de arcos de flechas y otros artículos deportivos como cañas de pescar.

En el mismo documento se citan diferentes usos medicinales. Así la corteza se usa en decocción contra diarreas y como febrífugo. En Guanacaste, Costa Rica, se toma con el propósito de aliviar el dolor de riñones y eliminar las piedras de la vesícula. En México, la infusión que se obtiene del cocimiento de las flores se utiliza contra la diarrea.

En Nicaragua, además, forma parte de las tradiciones, debido a que la floración de esta especie, que ocurre entre los meses de septiembre a enero, coincide con la celebración de La Purísima, por lo que se usa para adornar los altares.

3.2. Bosques tropicales y cambio climático

El cambio climático, se entiende como un cambio de clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera mundial y que se suma a la variabilidad natural del clima observada durante periodos de tiempo (Feria Nacional de la Tierra, 2008).

Según las Naciones Unidas, las principales causas del cambio climático, junto con la contaminación atmosférica, son los cambios de uso del suelo, la desertificación y la deforestación. La deforestación emite del 25 al 30% de los gases que crean el efecto invernadero, por lo que la mayoría de los científicos consideran que las actividades humanas están acelerando este cambio y las

causas naturales explican sólo una pequeña parte del calentamiento terrestre. Se considera que las temperaturas medias de la superficie terrestre habrán aumentado entre 1.4 y 5.8 °C al final del siglo, dado que en el siglo XX la subida media de las temperaturas fue de 0.6°C ±0.2°C(Guariguata, 2009).

La FAO (2006), considera que los bosques desempeñan cuatro funciones principales frente al cambio climático:

- Contribuyen a casi 1/6 de las emisiones de carbono cuando han sido desbrozados o explotados en exceso. Debido a que los árboles están compuestos de carbono en un 50%, una vez talado, ese carbono que almacenan regresa a la atmósfera.
- Los bosques reaccionan sensiblemente a los cambios del clima.
- Los bosques sosteniblemente ordenados, producen biomasa energética (dendrocombustibles) una alternativa más favorable que los combustibles fósiles, a efectos de emisiones de gases.
- Los bosques poseen el potencial de absorber 1/10 de las emisiones mundiales de carbono previstas para la primera mitad de este siglo en sus biomásas, suelos y productos.

Según este mismo informe, el carbono se acumula en la biomasa del ecosistema forestal a través de la fotosíntesis y, en términos generales, es aproximadamente el 50% de ella (en relación al peso seco). Este proceso ha hecho que los bosques se consideren sumideros de carbono, generalmente se reconocen 5 diferentes depósitos donde se acumula el carbono en el ecosistema forestal: en la masa vegetal sobre el suelo (arbustos y hierbas); en la masa vegetal del suelo, que incluye las raíces; en la masa vegetal de los árboles; en la masa vegetal muerta o necromasa; en la capa de material orgánico no descompuesto que se encuentra sobre el suelo hasta en profundidad de 30 cm.

En los bosques, el periodo de almacenamiento y la velocidad de fijación del carbono en la vegetación y el suelo, varían dependiendo de la especie y de la calidad de la zona, del clima y de las prácticas y alteraciones a las que esté sometida esa vegetación. A mayor cantidad de estructuras vegetales existentes, más carbono se encontrará almacenado en ellas, por lo que resulta obvio que la capacidad de fijación de las especie de crecimiento rápido, es mayor. Este mismo documento hace énfasis en que la relación entre los bosques tropicales y el cambio climático global se han centrado más en la mitigación, mientras que se ha prestado menos atención a cómo las actividades de manejo pueden ayudar a los ecosistemas forestales a adaptarse a dicho cambio.

Por capacidad de adaptación se entiende la capacidad de un sistema para ajustarse al cambio climático, a fin de mitigar daños potenciales, aprovechar oportunidades o afrontar las consecuencias (Parry *et al.*, 2008). Esto significa que, si bien puede existir el potencial de adaptación dentro del acervo genético de una especie, es muy probable que alguno de sus individuos no lo tenga. Es decir, los alelos necesarios para la adaptación al cambio climático en una región específica pueden estar presentes solamente, o en frecuencias mucho más altas, en poblaciones de otras regiones. El problema entonces es ¿cómo obtener la variación donde se le necesita?. Es muy posible que las especies que en el presente no tengan la capacidad de adaptarse bien a un lugar de siembra, no puedan lidiar con el estrés que puede ocasionar el cambio climático (Guariguata, 2009).

Existe una serie de razones por las que el manejo forestal tropical debería incorporar el tema de adaptación al cambio climático. En primer lugar, los bosques tropicales hacen importantes contribuciones a los medios de vida rurales (Sunderlin *et al.*, 2005).

Según Guariguata(2009), el cambio climático afectará a los bosques y los servicios ambientales que ellos brindan. Los impactos que se esperan en los ecosistemas forestales, por el cambio climático, son entre otros, aumento de incendios forestales, cambios en las zonas de vida de Holdridge (sistema de

clasificación de zonas de vida del mundo) y mayor presión por la producción/extracción de productos forestales (madera, leña) por parte del ser humano quien busca su sobrevivencia.

Lo que se acepta actualmente, según Guariguata (2009), es que cuando no se dispone de información derivada de una prueba genética, “la semilla local es siempre la mejor”. Sin embargo, en el caso del cambio climático, éste puede ya no ser el caso, puesto que es muy probable que las fuentes de semillas locales estén más adaptadas a las condiciones del pasado, en lugar de condiciones similares a las actuales y condiciones futuras. Una alternativa es elegir fuentes de semillas con mejor capacidad de adaptación.

Este autor advierte al sector forestal, al que considera le concierne el posible impacto negativo del cambio climático sobre las poblaciones naturales de especies de árboles importantes, dado que estos son las fuentes de diversidad genética (semillas) usadas para sustentar y mejorar la productividad de la plantación, en consideraciones presentes y futuras.

Al mismo tiempo, considera que a pesar de la importancia del aumento de la concentración de CO₂ en la atmósfera, la alteración de la temperatura global y patrones de precipitación, aún existen dudas sobre cómo las especies de árboles podrían responder al cambio climático. Esto es por tanto importante y relevante para comprender riesgos y el efecto del cambio climático en poblaciones naturales de especies arbóreas.

También menciona que la habilidad de las especies de árboles a persistir en sus actuales localidades, bajo nuevas condiciones climáticas es la clave para la sobrevivencia en comparación con otras formas de vida como hierbas y hormigas, dado que los árboles están limitados en su habilidad para colonizar una nueva área de clima apropiado debido a su largo ciclo de crecimiento.

3.3. Biología reproductiva de especies tropicales

3.3.1. Aspectos generales de la Biología Reproductiva

La biología reproductiva de las especies tropicales es un aspecto muy poco conocido a pesar de ser de gran importancia para el conocimiento de la dinámica y la perpetuación del bosque tropical. Por ello, se han tomado una serie de citas de diferentes autores que aparecen en el trabajo de tesis de Ribeiro (1999) y entre estas citas destacan:

Scariot *et al.*, (1991), afirman que conocer la biología reproductiva de las especies vegetales es muy importante debido a que dan un indicio sobre el flujo génico y así, de la diferenciación genética entre poblaciones. Consecuentemente, el conocimiento de los sistemas reproductivos es relevante para el manejo de bosques y la conservación de la diversidad biológica. Por ejemplo, Bawa *et al.*, (1985), sostienen que la intervención en el bosque altera la distribución espacial de los individuos lo que puede afectar la reproductividad, principalmente de las especies dioicas.

Kress y Beach (1994), mencionan todos los aspectos importantes para el conocimiento de cómo las plantas se relacionan en términos reproductivos. Los intentos por conocer los patrones de cruzamiento de las plantas mostraron que ellos están fuertemente influenciados por diferentes factores como, la densidad poblacional o la distribución espacial de las plantas, la fenología o la distribución temporal de las fases reproductivas, el sistema sexual y la autoincompatibilidad fisiológica, la cual contribuye para la disminución de la autogamia (definida como el cruzamiento dentro del mismo individuo).

Rocas (1980), señala con respecto a los sistemas reproductivos que es común observar en los bosques tropicales, dos tipos de polinización, la cruzada o exogamia y, la directa o autogamia. Ésta última es menos común que la primera, (pero siempre existe en algún grado en la gran mayoría de las especies). Las dos tipos de polinización son estrategias reproductivas que las plantas usan para permitir su perpetuación dentro del bosque.

Generalmente las poblaciones grandes de especies alógamas usualmente poseen gran cantidad de diversidad genética, pero ésta es reducida en poblaciones pequeñas. Las consecuencias de la diversidad genética es uno de los objetivos principales de la biología de la conservación. Se considera que el cambio ambiental es un proceso continuo y la diversidad genética se requiere para que las poblaciones evolucionen y se adapten a tales cambios (Frankham *et al.*, 2002).

En el estudio anteriormente mencionado de Bawa *et al.*, (1985), llevado a cabo en Costa Rica en bosque húmedo tropical en la Estación Biológica La Selva (LS) se demuestra que los árboles hermafroditas y dioicos están distribuidos en un gran número de familias. Por otro lado, la mayoría de las especies monoicas pertenecen a la familia Arecaceae, la cual contribuye con un 45% para el total de especies con este tipo de presentación floral (**ver tabla 1**).

C. candidissimum, pertenece a la familia Rubiácea que se caracteriza por ser dióica o hermafrodita.

Sexualidad floral	Número de familias	Porcentaje de especies
Hermafroditas	22	68.7% (22)
Dioicas	7	21.9% (7)
Monoicas	3	9.4% (3)
TOTAL	32	100

Fuente Ribeiro, 1999.

Tabla 1. Sexualidad floral en el bosque tropical húmedo de la región de La Selva

Un 80% de las especies estudiadas por estos especialistas se mostraron autoincompatibles, la cual es considerada por diferentes autores como una de las estrategias que las plantas poseen para evitar la autogamia. La misma estrategia es adoptada por la gran mayoría de las especies de los bosques

tropicales. Esto es importante al considerarse que la autogamia compromete la existencia de las especies a largo plazo, por la reducción de la base genética de las mismas (Ribeiro, 1999).

3.3.2. Biología reproductiva de la familia Rubiácea

La familia Rubiácea se caracteriza por ser dioica o hermafrodita, tal como reportan Bawa *et al.*, (1985). Como ejemplo refieren que las especies del género *Psychotria* que se encuentran en el sotobosque húmedo de La Selva, son hermafroditas en su gran mayoría.

De acuerdo a Kress y Beach (1994), las Rubiáceas son de las pocas especies del sotobosque autoincompatibles. A pesar de eso, en este tipo de especies la probabilidad de incompatibilidad con el vecino más próximo es considerablemente alta, debido a la ocurrencia de sistemas multialélicos. Estos permiten la existencia de grupos compatibles dentro de una población, lo que es importante si se considera que la compatibilidad entre individuos próximos puede en cierta medida reducir la base genética de la especie, comprometiendo su existencia a largo plazo.

A su vez Bawa y Beach (1983), estudiando 14 especies en la Estación Biológica La Selva, encontraron que 13 son autoincompatibles. Mientras que Stone (1995) estudiando los patrones de transmisión del polen en *Psychotria uerrensis*, un arbusto del sotobosque, determinó que el dimorfismo de las flores (estigmas cortos o largos) afecta la transmisión del polen entre individuos y los mecanismos de incompatibilidad.

3.4. Importancia de la conservación de los recursos genéticos

La conservación de los recursos genéticos en su ambiente natural, ya sea en los bosques de producción, o en áreas protegidas, se denomina conservación *in situ*. La conservación *in situ* implica que una población determinada se mantiene dentro de una comunidad de la que forma parte, en el ambiente en que se ha desarrollado (Frankel, 1976). El término se aplica frecuentemente a

las poblaciones silvestres que se regeneran naturalmente en áreas protegidas, pudiendo integrarse en bosques ordenados de producción y uso múltiple. La conservación *in situ* se orienta por tanto a la conservación de los recursos genéticos en su ecosistema original, independiente de que tales ecosistemas hayan estado sujetos a la intervención humana (FAO, CSFD, IPGRI, 2002).

La protección de la diversidad genética se ha establecido como objetivo prioritario en los planes de conservación. Se trata, a largo plazo de mantener la viabilidad evolutiva de las especies y para ello maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno cambiante. Por ello, son de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicas y centros de variabilidad genética para conservar especies amenazadas, diseñando actividades de conservación *in situ* y *ex situ*, para proteger la integridad de reservas genéticas nativas (Cardoso *et al.*, 1998; citado por Toribio y Celestino, 2000).

La conservación *ex situ* tiene como objetivo el mantenimiento de poblaciones viables de especies amenazadas fuera de su ambiente natural, a fin de apoyar a los programas de conservación *in situ*, asegurando a largo plazo la propagación de especies raras y en peligro de extinción. Para ello están los bancos de germoplasma, donde normalmente se conservan las especies, en los centros de tenencia y manejo de las especies de vida silvestre que se dividen en centros de rescate y jardines botánicos, viveros y herbarios. Los bancos de germoplasma incluyen mantenimiento de plantas enteras *in vivo* (en campo), conservación de semillas en cámaras frías y la técnica de cultivo de tejidos (*in vitro*), método utilizado especialmente para guardar duplicados de las colecciones. (GTZ/FUNDECO/IE, 2001).

Ashmore, (1997)(citado por Toribio y Celestino, 2000) en un informe del International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI, ahora Bioversity) indica que las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas

recalcitrantes. Más de cuarenta géneros y sesenta especies de plantas leñosas han sido objeto, en los últimos diez años, de intensos estudios para lograr protocolos fiables de crioconservación.

Como ejemplo de esfuerzos de conservación, González-Benito *et al.*, (1999) mencionan que se están desarrollando también protocolos para especies con semillas recalcitrantes. En el caso del género *Quercus*, se ha logrado recuperar el crecimiento de ejes embriónicos de *Q. suber* y *Q. ilex* encapsulados en cuentas de alginato.

Gallo *et al.*, (2005), afirman que los bosques constituyen el ecosistema terrestre más complejo. Los árboles son las especies centrales de ese ecosistema y los organismos que presentan mayor diversidad genética. Estos poseen características particulares como longevidad, amplia y variada distribución geográfica, exposición a ambientes extremos y variables durante su vida, entre otras, que los define como el paradigma de la conservación.

La conservación de la diversidad genética de las poblaciones forestales, para estos autores, adquiere vital importancia, puesto que constituye el material base de la evolución en general y de la adaptabilidad a los cambios ambientales en particular. Ante las predicciones de cambios climáticos globales y su probable efecto sobre organismos tan longevos, la conservación de la diversidad genética adquiere particular relevancia. Por otro lado, mantener la diversidad genética resulta indispensable en el aprovechamiento productivo sustentable de los recursos genéticos, tanto en el manejo de bosques nativos como en el mantenimiento de programas de mejoramiento estables a largo plazo.

También consideran que el primer paso es conocer el grado y la distribución de la variación genética, así como los principales procesos evolutivos que influyen sobre ella. A través de la información integrada que brindan los conceptos teóricos y las herramientas analíticas de la genética evolutiva poblacional, cuantitativa y molecular se pretende conocer mejor algunos procesos genéticos

de importancia evolutiva, para la conservación y utilización sustentable del recurso.

3.5.Genética de poblaciones y evolución

Según Barbadilla (s.f.), la genética de poblaciones es la disciplina biológica que suministra los principios teóricos de la evolución. En esta ciencia se parte del supuesto de que los cambios evolutivos a pequeña escala, los que se dan en el seno de las poblaciones de las especies, contienen todos los elementos necesarios para explicar toda la evolución. Este autor cita a Theodosius Dobzhansky, quien considera que la problemática de la genética de poblaciones es la descripción y explicación de la variación genética dentro y entre poblaciones.

Para Barbadilla (sf), desde el punto de vista de la población, la evolución es en último término, un cambio acumulativo e irreversible de las proporciones de las diferentes variantes de los genes o alelos en las poblaciones.

3.6. Diversidad genética

La diversidad genética, es la variación en la composición genética de los individuos dentro de la especie o entre especies. Según Ramanatha y Hodgking (2002), existen cuatro componentes de la diversidad genética que pueden ser distinguidos:

- El número de diferentes formas alélicas encontradas en diferentes poblaciones.
- Su distribución.
- El efecto que las diferentes formas alélicas tiene sobre la función o el desempeño del individuo.
- La distinción total entre diferentes poblaciones.

La diversidad genética es generada por mutación y recombinación genética. La cantidad y distribución de la diversidad genética (frecuencia de diferentes alelos) es el resultado de la interacción de varios procesos evolutivos y de especiación. Por lo tanto, proporciona información útil para programas en mejora genética y en la planificación de estrategias de conservación (Wright, 1978).

3.6.1. Causas de la diversidad genética

La mutación

Según Barbadilla, (s.f) la fuente última de toda variación genética es la mutación. Una mutación es un cambio estable y heredable en el material genético. Las mutaciones alteran la secuencia del ADN y por tanto introducen nuevas variantes. Las mutaciones son como un cambio al azar de una letra por otra en un texto. Este cambio suele producir una falta de significado, y por eso la mayoría de las mutaciones son deletéreas, debido a esto muchas de estas variantes suelen ser eliminadas, pero ocasionalmente algunas de estas variantes pueden tener éxito e incorporarse en todos los individuos de la especie. La mutación es un factor que aumenta la diversidad genética.

Para este mismo autor, la tasa de mutación de un gen o una secuencia de ADN es la frecuencia en la que se producen nuevas mutaciones en ese gen o la secuencia en cada generación. Una alta tasa de mutación implica un mayor potencial de adaptación en el caso de un cambio ambiental, pues permite explorar más variantes genéticas, aumentando la probabilidad de obtener la variante adecuada necesaria para adaptarse al reto ambiental.

Cada especie tiene una tasa de mutación propia, que ha sido modulada por la selección natural para que la especie pueda enfrentarse a los compromisos contrapuestos de cambio que le impone su ambiente (Barabadilla, s.f)

Recombinación sexual

López (2005) afirma que en las especies con reproducción sexual, los individuos de una población tienen diferentes fenotipos, debido a que existen dos mecanismos de que causan variabilidad genética durante la meiosis que son el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos (*crossing-over*) durante la primera división por y la segregación durante la segunda división, cuando segregan los genes al azar.

La recombinación genética es una importante fuente de homeostasis (mantenimiento de un ambiente fisiológico interno o de un equilibrio interno relativamente estable en un organismo) en organismos con reproducción sexual, y si ocurre entre poblaciones separadas que tienen homeostasis genotípicas, esto repercute en una mayor riqueza genética.

Durante la meiosis se forman los gametos o células sexuales (polen y gametofito femenino) y de acuerdo a este mismo autor, la unión de los gametos durante la reproducción sexual se puede dar entre individuos de una misma población, individuos de diferentes poblaciones (migración) y entre diferentes especies (híbridos).

La migración o flujo de genes

El intercambio de genes entre poblaciones debido a la migración de los individuos entre localidades, según Barbadilla (sf), es otro factor importante de cambio genético. Si dos poblaciones difieren en las frecuencias de los alelos de algunos de sus genes, entonces el intercambio de individuos entre ellas producirá un cambio de las frecuencias de los genes en cada una de las poblaciones.

Por migración se introducen nuevos genotipos en la población, lo cual aumenta la variabilidad genética. Si son pocos los migrantes, la tendencia es hacia la homogeneización, restableciéndose la homeostasis del genoma.

Híbridos

En el caso de recombinación genética entre organismos de diferentes especies, donde se conjugan genomas incompatibles, los híbridos resultantes son inviables o estéril. Por ejemplo, la progenie puede ser inviable, viable pero estéril o viable y fértil en dependencia o no de la proximidad filogenética entre las especies. Los descendientes de la retrocruza de híbridos con uno de sus parentales generalmente son más exitosos. Además, la combinación de hibridación y poliploidía puede conducir a un balance cromosómico (López, 2005).

Heterocigosis y vigor

La heterocigosis según López (2005) se manifiesta como vigor híbrido. El vigor aumenta en proporción de la cantidad de heterocigosis. El vigor del heterocigoto supera el promedio de ambos progenitores.

En plantas, el vigor de heterocigoto se manifiesta como:

- Mayor rendimiento de semillas, crecimiento vegetativo o frutos;
- Mayor resistencia a plagas y enfermedades;
- Mayor eficacia biológica para la reproducción y sobrevivencia.

La selección

Es tan sólo uno de los factores de evolución. Pero es el único proceso conocido que permite explicar la complejidad inherente a la vida, las adaptaciones de los organismos, y por eso ocupa una posición central en la biología evolutiva. Y la define como reproducción diferencial de unas variantes genéticas respecto de otras (Barbadilla,s.f).

Según López (2005), la selección natural no crea especies, su función se restringe a eliminar individuos con características desfavorables para la población y conservar a los más aptos para las condiciones que se presenten

en un momento determinado, pudiendo no ser los mejores para las siguientes condiciones. La naturaleza no predice el futuro, los organismos parecen estar adaptados a las condiciones ambientales actuales, pero sólo lo está en función de las condiciones pasadas. La supervivencia de un gen en un acervo de genes depende de su contribución total a la adaptación de una población.

3.6.2. Pérdida de la diversidad genética

Los recursos genéticos forestales han sido afectados debido a la disminución de las áreas que antes pertenecían a bosques y a causa del avance de la frontera agrícola, tanto en cantidad de área como en cantidad de especies por área. Estos recursos han sido objeto de extracción sin un manejo adecuado, cambiando totalmente la estructura del ecosistema y afectando así la variedad genética (FAO, 2003), esta afectación sumado a cambios del ambiente causados de forma natural como por ejemplo, huracanes, sequías e incendios forestales contribuyen a reducir la variabilidad genética trayendo como consecuencia los siguientes mecanismos que contribuyen a establecer la pérdida de la diversidad:

La endogamia

La pérdida de la diversidad genética reduce la capacidad de reproducción y sobrevivencia a mediano plazo, debido a que a menudo es asociada con endogamia y reducción del *fitness* y a largo plazo reduce la capacidad de las poblaciones para evolucionar en respuesta a los cambios ambientales (Frankham *et al.*, 2002). La autofecundación es la forma más severa de endogamia e implica la disminución de la variabilidad genética, la que conduce a una menor capacidad de adaptación ante cambios en las condiciones ambientales (Fontdevila, 1999).

Las cruas internas al igual que la erosión genética conducen a la condición homocigota y también pueden reducir la adaptación del individuo cuando los alelos cuya frecuencia aumenta son recesivos y producen efectos dañinos (Starry Taggart, 2004).

Las cruas consanguíneas por apareamiento entre individuos emparentados conlleva a la pérdida de heterocigosis y al aumento de homocigosis, manifestándose los genes recesivos, con efectos como reducción del tamaño, pérdida del vigor, pérdida total o parcial de la fertilidad, progenie inviable o menos competitiva (Fontdevila, 1999).

Los cuellos de botella

Según Starr y Taggart (2004), la diversidad genética se reduce cuando hay “cuellos de botella”, es decir, cuando una población disminuye su tamaño sustancialmente y quedan pocos individuos, por alguna presión intensa o alguna calamidad; por ejemplo, enfermedades infecciosas, pérdida del hábitat. Aunque un número moderado de individuos logre sobrevivir al cuello de botella, las frecuencias de los alelos resultaran modificadas al azar.

Los cuellos de botella y la reproducción entre miembros de una misma población constituyen una mala combinación para las especies en peligro y cuyas poblaciones se han hecho muy pequeñas y son vulnerables a la extinción (StarryTaggart, 2004).

Diversidad genética

El resultado de la deriva genética suele ser la pérdida de variabilidad genética, siendo un proceso que contrarresta la entrada de variabilidad genética por mutaciones (Barbadilla, s.f.).

Según López (2005) la deriva génica explica la fijación de características independientemente de la adaptación al ambiente por circunstancias azarosas a nivel molecular, celular, individual o poblacional. En organismos con reproducción sexual este mecanismo es muy importante, ya que la segregación genética y muchos procesos moleculares a nivel celular se rigen por el azar, siendo la expresión fenotípica producto de la expresión genética.

3.6.3. Estructura de las poblaciones

Según Dujardin *et al.*, (s.f.), la estructura geográfica de poblaciones se refiere a como el territorio de una especie se halla ocupado en, poblaciones geográficas espaciadas, poblaciones contiguas, en poblaciones ininterrumpidas. Para ello es necesario saber que para el estudio de la estructura de las poblaciones se debe conocer si en la continuidad aparente de su distribución geográfica, existen o no poblaciones físicamente aisladas entre ellas, tratando de conocer si el flujo génico recorre indiferentemente por todas las poblaciones, o si están geográficamente fragmentadas.

De acuerdo a Slatkin(1994), la estructura de las poblaciones consiste en dos partes distintas pero interrelacionadas: la estructura demográfica y la estructura genética. La estructura **demográfica** está determinada por todos los procesos asociados al nacimiento, muerte y dispersión, incluyendo el sistema de apareamiento y la historia de vida. La estructura **genética** está determinada por la estructura de la población, por procesos genéticos como la selección, la recombinación y la mutación.

Para determinar la estructura genética, es necesario comprender el patrón de variación genética de la especie, lo que significa evaluar los genotipos de diferentes individuos. En los últimos treinta años, el desarrollo de la metodología en bioquímica ha permitido examinar muchas porciones del genoma utilizando electroforesis de proteínas, enzimas de restricción y secuenciación del ADN.

Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

3.7. Genética forestal

Se puede esperar diferencias entre poblaciones de árboles de una misma especie, debido a la presión selectiva del ambiente en el que se desarrollan. Por ejemplo, árboles de una misma especie en varios ambientes:

- La población está adaptada a un ambiente seco.
- En montaña la población con clima húmedo tiene mayor requerimiento de agua.

Ciertos árboles tienen un potencial genético con un rango amplio de plasticidad, de tal forma que pueden adaptarse a varios ambientes, modificando su comportamiento fisiológico según las condiciones de cada lugar. Por ejemplo, crecen en sitios favorables y desfavorables (secos y estériles). Cuando las especies tienen una gran plasticidad pueden adaptarse a un amplio rango de condiciones ambientales, por ejemplo, el *Pinus radiata* se planta en muchas partes del mundo con éxito, siendo mejor su desarrollo en muchos sitios diferentes al nativo.

3.8. Mejoramiento genético

Según López (2005), el objetivo del mejoramiento genético es la producción de fenotipos que tengan las características deseadas.

Las técnicas para lograr esto comprenden lo siguiente: **la selección de árboles**. Si se colectan semillas de una población al azar, corresponderán a árboles con características muy variables (deseables e indeseables), por lo que es preferible colectar semillas de árboles seleccionados esperando que la progenie herede las características deseables del progenitor.

Si la selección corresponde a los mejores individuos se dice que son árboles superiores y normalmente se etiquetan para que puedan reconocerse con facilidad **la cruce de árboles selectos**. Entre la progenie se escogen los

individuos más prometedores para ser los padres en futuras cruzas (**prueba de progenie**). Por ejemplo, si el árbol tiene una forma deseable pero es susceptible a una enfermedad y otro árbol con forma inferior o no deseable es resistente a la enfermedad, se busca que entre la progenie de la cruce haya individuos que combinen la forma deseable y la resistencia.

Entre las características deseables del mejoramiento genético, este autor cita que generalmente son: forma de la copa, fuste, área foliar grande, capacidad para formar micorrizas, ausencia de semillas y frutos en árboles madereros y alta producción de semillas y frutos en árboles semilleros y frutales, resistencia al estrés.

3.9. Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales

3.9.1 Generalidades de la extracción de ADN vegetal

De acuerdo a Rocha (2002), el primer paso para desarrollar experimentos con marcadores moleculares es la extracción del material genético de plantas que interesa estudiar por sus características fenotípicas y agronómicas. Según este autor para la extracción del ADN vegetal es necesario tener en cuenta tres factores.

- a) El tipo de planta y de tejido que se va a emplear como fuente.** Los tejidos jóvenes contienen más ADN que los tejidos viejos. Además, es necesario considerar la composición bioquímica de los tejidos. Por ejemplo, el método de extracción del material genético proveniente de tejidos ricos en compuestos fenólicos es diferente al método empleado con tejidos ricos en carbohidratos o aceites.

- b) El tipo de ADN que se va a extraer.** Las plantas poseen tres tipos de ADN: el nuclear, el mitocondrial y el cloroplástico. Reciben estos nombres dependiendo del tipo de organelo celular en el que se encuentre. Los distintos tipos de ADN tienen características bioquímicas

semejantes. Sin embargo, el tipo de información biológica que codifican es completamente diferente.

- c) **El tipo de análisis a realizar.** Con base en la cantidad y la calidad del ADN se puede desarrollar diversas técnicas de análisis tales como RFLP, RAPD, AFLP y secuenciación.

3.9.2. Pasos generales para extraer y purificar ADN

El objetivo principal en un experimento de extracción de ADN es obtener una preparación de buena calidad y en cantidad suficiente. La calidad se refiere a la posibilidad de almacenar el ADN por tiempo indefinido, manteniendo su estructura y propiedades, siendo la calidad del ADN el factor responsable de la reproducibilidad en experimentos posteriores. La cantidad es relativa. Depende, entre otros, del número y estado de las células propias del tejido a estudiar. Por lo tanto, un buen método de extracción debe mantener la integridad física y bioquímica del ADN e incrementar sus rangos de pureza y concentración (Sambrook *et al.*, 2001).

En plantas existen múltiples protocolos para extraer y purificar el ADN. Sin embargo, según Rocha (2002) todos ellos incluyen cuatro pasos indispensables.

- a) **Lisis de tejidos y paredes celulares.** Este paso consiste en pulverizar el material vegetal a bajas temperaturas, generalmente empleando nitrógeno líquido o hielo seco. También existe la pulverización en seco, un proceso en el cual los tejidos se deshidratan por secado en un horno o con silicagel. Para degradar paredes celulares se pueden utilizar, además, enzimas tipo celulasas.
- b) **Lisis de membranas.** Una vez que el tejido es disgregado en células, se hace necesario romper las membranas celulares para liberar el ADN. Esto puede ser llevado a cabo químicamente con detergentes SDS, CTAB o detergentes comerciales. También se emplean métodos físicos,

como aquellos basados en ultrasonido u sonicación que es el proceso por el cual se forman liposomas unilaminares a partir de liposomas multilaminares.

c) Inhibición de enzimas que destruyen al ADN. Como un mecanismo de defensa natural, las células contienen enzimas que destruyen al ADN (ADNasas). Estas enzimas deben ser inactivadas para garantizar la calidad de las preparaciones de ADN. La inhibición puede realizarse mediante métodos físicos, tales como desnaturalización por calor (a temperaturas de 65 C) o con métodos químicos. Estos últimos incluyen tratamiento con solventes orgánicos (fenol y cloroformo), con antioxidantes (Ditiothreitol y β -mercaptoetanol), con agentes quelantes (EDTA, EGTA) que capturan los iones magnesio necesarios para la funcionalidad de las ADNasas, o con agentes caotrópicos que actúan removiendo el agua estructural de las proteínas, dos de los agentes caotrópicos más utilizados son la urea y un detergente iónico denominado dodecilsulfato sódico (SDS). Por lo general se utilizan mezclas de varios de estos reactivos para asegurar la inhibición de tales enzimas.

d) Extracción de contaminantes. El objetivo de extraer ADN es obtener preparaciones enriquecidas en esta molécula. Sin embargo, el ADN está asociado con proteínas (histonas) e inmerso en un medio que contiene estructuras de composición química diversa. Además, los reactivos empleados en los procesos iniciales de purificación se convierten en agentes contaminantes. Las metodologías para retirar los contaminantes de una preparación de ADN incluyen: la centrifugación a altas velocidades, la electroforesis, la separación a través de columnas e incluso la utilización de imanes (biomagnética) para obtener preparaciones de alta pureza. Un contaminante generalmente presente en preparaciones de ADN es el ácido ribonucleico (ARN). Esta molécula se degrada por incubación con la enzima ARNasa.

Para Rocha (2002), todos los pasos anteriormente mencionados se basan en las características fisicoquímicas del ADN. Pues aparte de ser una molécula de alto peso molecular, muy larga y delicada, es un ácido capaz de formar sales con iones cargados positivamente (cationes). Además, es soluble en soluciones concentradas de sales, pero insoluble en alcoholes (etanol o isopropanol), por lo que estos se utilizan para su precipitación.

Según Howell(1973), citado por Rocha (2002), el ADN es destruido (depurinado) a pH ácido (menor de 4,0), es insoluble a pH 5.6, pero es soluble a pH 8,0. Por lo tanto, los procesos de extracción, purificación y almacenamiento del ADN deben mantener el pH óptimo y brindar una alta concentración iónica. Las temperaturas de incubación deben ser menores de 80°C, para evitar degradar al ADN y permitir la ruptura de lípidos de la membrana y liberar su contenido.

3.9.2.1. Funciones de soluciones en el proceso de extracción de ADN

CTAB (HexadecilTrimetil Bromuro de Amonio): detergente catiónico, desorganiza proteínas, lo que permite la desintegración de membranas.

Además, se utiliza para separar polisacáridos que contaminan el ADN, la base para esta separación es la diferencia de solubilidad de las dos moléculas en presencia de CTAB.

SDS:detergente que destruye las membranas, disocia proteínas y polisacáridos.

EDTA (ácido etilendiamintetracético): agente quelante, que inhibe a las nucleasas, al no permitirle obtener el ión Mg^{++} que requieren como cofactor.

TRIS (hidroximetil amino metano): tampón biológico que estabiliza el pH de la solución, entre 7 y 8. El pH 8 del buffer elimina la posibilidad de que enzimas actúen sobre el ADN (lipolíticas, lipooxigenasas o DNAsas nucleares que actúan a pH más bajos).

B-Mercaptoetanol: antioxidante protege al ADN contra las actividades de enzimas como peroxidasas y polifenoloxidasas, desnaturalizándolas.

NaCl:(cloruro de sodio): forma capa iónica suave que recubre al ADN protegiéndolo, para evitar la degradación por acciones enzimáticas, y a altas concentraciones solubiliza el ADN. También se utiliza para remover polisacáridos, ya que aumenta su solubilidad en etanol, lo que hace que no co-precipiten con el ADN.

Cloroformo: solvente orgánico, desnaturaliza proteínas ayudando a la disociación entre los ácidos nucleicos y las proteínas. También remueve lípidos. La alta densidad de cloroformo potencia la separación de las fases, facilitando la remoción de los ácidos nucleicos con muy poca contaminación del material orgánico.

Alcohol Isoamílico u octanol: usualmente se agrega para prevenir la formación de espuma, cuando forma parte del Cloroformo-alcohol (24:1).

Isopropanol frío: alcohol al 100%, que precipita ácidos nucleicos.

Etanol al 70%: a esta concentración es utilizada en lavados durante la extracción por que inhibe actividad enzimática y remueve sales.

PVP (polivinilpirrolidona): para remover polifenoles, forman complejos de enlaces de hidrógenos con compuestos polifenólicos, los cuales se pueden separar del ADN por centrifugación.

Acetato de sodio: sal que precipita al ADN.

Acetato de amonio: sal que precipita proteínas.

ARNasa: degrada ARN.

Proteinasa K: es una proteasa con una actividad específica, la cual consiste en degradar proteínas. Esta enzima actúa rompiendo los enlaces débiles del polipéptido, hasta que adquiera su estructura primaria y, por lo tanto, pierda su funcionalidad (Sambrook *et al.*, 2001).

CONTAMINANTE	TRATAMIENTO
Polisacáridos	Uso de detergentes (CTAB, SDS).
Lípidos y grasas	Incubación enzimática (con lipasas). Uso de detergentes (SDS, Triton). Tratamiento con cloroformo, alcohol isoamílico
Proteínas	Incubación enzimática (con proteasas). Extracción con fenol y cloroformo. Uso de detergentes.
Pigmentos	Uso de alcoholes.
ARN	Incubación enzimática (con ARNasa). Electroforesis. Cambios en el pH
Alcoholes	Evaporación a temperatura ambiente.
Compuestos fenólicos	Tratamiento con cloroformo y alcoholes
Detergentes	Uso de solventes orgánicos
Sales	Uso de etanol al 70%.
Sólidos insolubles	Uso de soluciones acuosas con posterior centrifugación

Tabla 2. Algunos agentes contaminantes en preparaciones de ADN (basado en Sambrook *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1993; Rogers y Bendich 1988).

3.9.3. Marcadores Moleculares

Existen diversas definiciones de lo que es un marcador molecular. Picca *et al.*, (2004) los define como “segmentos particulares de ADN que evidencian polimorfismos que pueden localizarse en una región codificante o no, y revelar la ocurrencia de cambios genéticos entre dos o más individuos y que son representativos a nivel de todo el genoma”. Un marcador molecular de mayor interés es aquel que, debido al ligamiento, puede usarse para indicar la presencia de otro gen; es decir, cualquier característica A (sea un gen, una proteína, tipo de hoja.) que esté asociada a la presencia o expresión de una característica B (como vigor, altura, resistencia a enfermedades.) puede considerarse como un marcador, pues la presencia de A necesariamente implica la de B (Solís *et al.*, 2005).

Los marcadores moleculares han venido a reemplazar o a complementar los marcadores morfológicos. Esto se debe a que los marcadores moleculares son ilimitados y se encuentran distribuidos por todo el genoma, además no están influenciados por el ambiente. Un marcador debe caracterizarse por que la variación pueda ser detectada y su herencia monitoreada (Núñez, 2000; citado por Azpiroset *et al.*, 2008). Estos mismos autores señalan que estos marcadores constituyen una poderosa herramienta para los estudios de genética de poblaciones, ya que permiten estimar los niveles de variabilidad genética intrapoblacional y analizar las relaciones genéticas existentes entre las poblaciones naturales (Hedrick, 2000; citado por Azpiroset *et al.*, 2008).

3.9.4 Importancia de los marcadores de ADN

La importancia de los marcadores radica en que ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés para el hombre. En ocasiones, el uso de marcadores permite seleccionar los individuos aun antes de que expresen el rasgo de interés. Gracias al empleo de marcadores, ha sido posible mejorar muchas especies que son la base de la alimentación del mundo (Solís *et al.*, 2005).

Según Martínez (2003), los marcadores de ADN permiten caracterizar la naturaleza, amplitud, y distribución de la variabilidad genética de especies vegetales, por tanto, facilita la toma de decisiones sobre qué y cómo conservar. En la actualidad, un valor considerable en la investigación estratégica a largo plazo, son los estudios sobre estos marcadores que están contribuyendo considerablemente a aumentar el conocimiento sobre los mecanismos genéticos y su organización genómica a nivel molecular.

La utilización de marcadores moleculares implica la identificación, mediante técnicas bioquímicas muy perfeccionadas, de la variación en moléculas celulares como el ADN y las proteínas, contrariamente a las características fenotípicas de los individuos en estudio, como vigor, calidad del tronco y diversos aspectos morfológicos. Estos marcadores ofrecen la ventaja de que no cambian por efecto del medio ambiente, ni por fase de desarrollo de la planta. Además, son muy numerosos. Estos atributos han hecho posible la aplicación de los marcadores moleculares en el estudio de mejoramiento genético forestal (Rivera *et al.*, 1998).

En lo que respecta a las especies arbóreas forestales, el estudio de los caracteres cuantitativos será en el futuro el centro de esas actividades, las cuales deberán concentrarse en unas pocas especies prototípicas como podría ser el caso del *Pinustaeda* (pino de incienso) (Park *et al.*, 1998).

Los marcadores de ADN también se están utilizando en estudios sobre la dispersión de polen y semillas, característica que condiciona factores tales como el parentesco y sus relaciones con las progenies. Tiene una fuerte influencia sobre la estructura genética de las especies. Con este fin se han desarrollado marcadores SSR en especies tales como *Camelliajaponica* (Ueno *et al.*, 1999).

En la especie *Calycophyllumspruceanum* se han revelado marcadores AFLP para estudiar la partición de la variación dentro y entre poblaciones mediante análisis de varianza molecular (AMOVA), tratando de encontrar una

estructuración ligada a distancias geográficas y determinada por la dispersión de las semillas (Russell *et al.*, 1999).

3.9.5. Tipos de marcadores

Los marcadores genéticos, según IPGRI y CornellUniversity (2003), se clasifican en:

- Marcadores morfológicos
- Marcadores bioquímicos
- Marcadores de ADN

3.9.5.1. Marcadores morfológicos

Los marcadores morfológicos son aquellos cuya expresión genotípica es observada a simple vista, siendo generalmente asociada a caracteres como colores, formas o dimensiones expresadas en los individuos; son caracteres influenciados por el ambiente y por interacción génica (epístasis) por lo que es difícil diferenciar los efectos genéticos de los efectos ambientales (Trujillo, 2004). Por ejemplo, en los árboles de pino podemos usar como marcadores morfológicos el peso o tamaño de las semillas, pues se ha visto que dicha característica se asocia en la mayoría de las poblaciones con la supervivencia, el crecimiento y la reproducción (Solís *et al.*, 2005).

3.9.5.2. Marcadores bioquímicos

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas que constituyen la primera generación de marcadores moleculares. El término isoenzima define un grupo de múltiple forma moleculares de una misma enzima que ocurre en una especie, como resultado de más de un gen codificando cada una de la enzimas (Tononet *al.*,2002; citado por Cerda, 2007).

Este mismo autor enumera las siguientes desventajas de la técnica de isoenzimas. A pesar de que han jugado un papel importante en muchas áreas de la biología desde su descubrimiento: **(1)** presentan problemas técnicos; **(2)** no permiten cubrir todo el genoma, pues sólo representan una estrecha fracción del contenido genético; **(3)** únicamente detectan la variación de los genes que codifican para la expresión de una característica del individuo; **(4)** se dificulta la precisión de los datos obtenidos debido al polimorfismo en el tejido de las isoenzimas (por ejemplo, el polimorfismo detectado en una hoja no es el mismo que el que se obtiene usando la semilla del mismo individuo); **(5)** tienen polimorfismo ontogenético, lo cual implica que los resultados obtenidos serán muy diferentes al trabajar con material vegetal proveniente de un árbol joven y de otro adulto; **(6)** las isoenzimas son específicas para determinados sustratos.

También señala las ventajas que estos marcadores presentan, como por ejemplo, el que la técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva debido a que utiliza pequeñas cantidades de material. Además, el control genético de la mayoría de las isoenzimas es bien conocido, por lo que es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles.

3.9.5.3. Marcadores de ADN

Pueden provenir de un fragmento específico de ADN, correspondiente a regiones codificantes o no codificantes del genoma, y detectar la variabilidad directamente a partir de la secuencia de ADN, basándose ya sea en el uso de enzimas de restricción o la técnica de PCR, entre muchos otros (Solís *et al.*, 2005).

De acuerdo a Picca (2004), los marcadores moleculares pueden ser clasificados en tres grupos:

- **Marcadores basados en la hibridación del ADN:** Estos tipos de marcadores involucran la detección de un segmento específico (marcador) en el ADN de estudio por hibridación con un fragmento

marcado radiactivamente de secuencia complementaria al marcador (sonda). Esto implica que el investigador que busca estudiar un gen de interés; los más utilizados en plantas son los **RFLP** (restriction fragment length polymorphisms) o polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción de ADN.

Y los minisatélites o **VNTR** (variable number of tandem repeats) número variable de repeticiones en tándem.

- **Marcadores basados en la amplificación del ADN:** mediante la reacción de PCR (polymerase chain reaction) o reacción en cadena de la polimerasa de ADN como **RAPDs** (random amplified polymorphic DNAs) o fragmentos polimórficos de ADN amplificados aleatoriamente, **SSR** (simple sequence repeats) o microsátélites. **CAPs** o digestión de secuencias polimórficas amplificadas.
- **Marcadores mixtos:** Son aquellos que resultan de la combinación de otros tipos de marcadores moleculares como **AFLP** (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de ADN) puede considerarse como una combinación de RFLP y RAPDs.

Ventajas y aplicaciones de los marcadores de ADN

- No son afectados por el ambiente,
- Están presentes en cualquier estadio del individuo,
- Permiten una detección temprana,
- Son universales y muy abundantes,
- Se requiere poca cantidad de ADN para los análisis y el ADN es muy estable y específico para cada individuo (Solís *et al.*, 2005).

En algunos casos, son relativamente costosos, necesitan personal entrenado, equipos sofisticados y un estricto control de la contaminación. A pesar de ello, estos marcadores han tenido una difusión extremadamente rápida, tanto en

análisis genéticos como en el mejoramiento de plantas. Entre las principales aplicaciones que cita el autor incluyen:

- La obtención de “huellas genéticas” (fingerprinting) genómicas de individuos, variedades y poblaciones;
- El análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales, de mejoramiento genético y bancos de germoplasma;
- El establecimiento de relaciones filogenéticas entre poblaciones y especies;
- La construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico, mapeo de características de herencia cuantitativa Quantitative Trait Loci (QTL) y selección asistida por marcadores (Marker Assisted Selection).

Tabla 3. Comparación entre marcadores morfológicos y moleculares

Marcadores Morfológicos

- Influencia del ambiente
- Bajo número
- Baja cobertura del genoma
- Bajo nivel de polimorfismo
- Menos informativos (dominantes o recesivos)
- Caracteres de madurez
- Entrenamiento y subjetividad

Marcadores Moleculares

- Sin influencia ambiental y neutros
- Cantidad ilimitada.
- Amplia cobertura del genoma
- Alto nivel de polimorfismo
- Más informativos (en general codominantes)
- Análisis en fases tempranas
- Sencillos, rápidos y objetivos

Fuente: Heinz, 2008.

3.9.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La siguiente descripción de la técnica fue tomada de Gómez y Echenique, (2004).

La PCR es una tecnología poderosa que involucra la **síntesis enzimática *in vitro*** de millones de copias de un segmento específico de ADN. La reacción se basa en la hibridación y extensión de un par de oligonucleótidos, sintetizados artificialmente, utilizados como iniciadores o cebadores (*primers*) que delimitan una secuencia de ADN de doble cadena que se desea amplificar.

El principio de esta técnica se basa en la amplificación al azar de fragmentos de ADN usando dos cebadores, ADN genómico molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y ADN polimerasa(Taq). Esta reacción es sometida a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, lo que permite la amplificación *in vitro* de múltiples fragmentos de ADN a partir de una cadena molde:

- Desnaturalización
- Hibridación
- Extensión

La doble cadena de ADN se desnaturaliza por elevación de la temperatura a 92-95°C. Luego la temperatura se baja rápidamente a 35-60°C, dependiendo del tamaño y secuencia del oligonucleótido utilizado, permitiendo la hibridación de cada cebador de ADN con secuencias complementarias y que flanquean la región objetivo. Los cebadores se unen en direcciones opuestas en dos hebras complementarias. Luego, se eleva la temperatura a 72°C para que la Taq polimerasa (una ADN polimerasa termoresistente aislada de *Thermusaquaticus*, bacteria que vive en fuentes termales) realice la replicación a partir de cada extremo 3' de los cebadores

Este ciclo es repetido varias veces y, como el producto de cada polimerización sirve como molde para el siguiente, cada ciclo duplica la cantidad del producto anterior (crecimiento exponencial). El resultado de la reacción es un fragmento de ADN de doble cadena, cuyos extremos corresponden a los extremos 5' de los *primers* y su tamaño a la distancia entre los mismos. A pesar de que se forman moléculas más largas a partir del molde original en cada ciclo, estos se acumulan solo a una tasa lineal y no contribuyen significativamente a la masa total de la secuencia blanco.

Después de tan solo 20 ciclos se logra más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia del ADN de interés. Esta escala de amplificación permite, por lo tanto, iniciar el proceso con cantidades mínimas de ADN (del orden de picogramos o nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de ADN. La versatilidad de esta reacción es enorme y la combinación de la PCR y la secuenciación constituye una poderosa herramienta para el análisis de genes.

La tecnología de PCR es de suma utilidad para amplificar ADN a partir de fragmentos clonados en distintos vectores. Este autor menciona que solo se necesita un par de iniciadores complementarios a los sitios del vector que flanquean el fragmento para amplificar cualquier fragmento independientemente de su secuencia; sin embargo, es bien conocido que para sintetizar los dos cebadores o iniciadores, se debe conocer a priori la secuencia del fragmento flanqueante de la región del ADN que se quiere amplificar.

3.9.7. ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Este método fue descrito por Williams *et al.*, (1990), quienes lo denominaron Amplificación al Azar del ADN polimórfico, RAPD por sus siglas en inglés, y a los polimorfismos que se producen los denominan “**Marcadores RAPD**”. Los destacan como un proceso simple basado en la amplificación de ADN genómico con secuencia de nucleótidos arbitraria, que detectan polimorfismos que funcionan como marcadores genéticos. Son de carácter dominante es decir, no es posible distinguir cuando un segmento de ADN ha sido amplificado a partir de un locus heterocigoto (2 copias) u homocigoto (1 copia) (Xena de Enrech, 2002).

La técnica RAPD produce fragmentos de ADN amplificado por la PCR utilizando oligonucleótidos sintéticos cortos (generalmente de 10 pb) de secuencia aleatoria. Estos oligonucleótidos normalmente son capaces de amplificar fragmentos de 1-10 sitios genómicos simultáneamente. Los

fragmentos amplificados por lo general presentan un tamaño de 0.5-5 kb. Estos son separados por electroforesis en gel de agarosa y los polimorfismos se detectan después de la tinción con bromuro de etidio, como la presencia o ausencia de bandas con diferentes tamaños. También se pueden clasificar de acuerdo a su intensidad de tinción (fuerte, mediana, débil) (Spooner, 2005).

Xena de Enrech (2002), considera que la presencia de polimorfismo se debe principalmente a la aparición de un nuevo sitio de reconocimiento del cebador, pero que también puede ser generado por las diferencias de longitud de la región amplificada, lo cual puede ser un reflejo de la especificidad de la amplificación. Igualmente, este autor propone que el polimorfismo detectado puede deberse a un simple cambio de un par de bases, por inserciones o deleciones que modifican o eliminan el sitio de unión del cebador; o también a inserciones en la secuencia genómica que separan los sitios de unión del cebador a una distancia que no permite la amplificación la distancia máxima de inserción de las copias del cebador no deben exceder a 2500 pb para lograr la amplificación del segmento.

Muchos autores están de acuerdo en que los RAPDs proveen una enorme fuente de datos y por lo tanto pueden ser más informativos acerca de la estructura de las poblaciones y su diversidad genética que las isoenzimas (Spooner, 2005). Demeyet *et al.*, (2003), afirman que los RAPDs se encuentran entre las técnicas de marcadores moleculares más usadas para caracterizar y evaluar la variabilidad genética en una gran variedad de especies vegetales. Se cuenta con antecedentes en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León de la aplicación de la técnica RAPD para estudios de variabilidad genética en las siguientes especies: *Jatropha curcas* (Picado, 1997; Williams & Ramos, 2000) *Sabal mexicana* (Guido, 2005), *Pachiraquinata* (Dolmus & García, 2006), *Musa sp.* (Reyes & Ríos, 2006), *Pinustecunumanii* (Cerdeña, 2007) y *Cedrela odorata* (Tijerino, 2009 y Soza, 2011).

No se encontró antecedentes de otros estudios RAPDs en *C. candidissimum*, solamente se encontró un estudio en AFLP en la especie *C. spruceanum* realizado por Russell *et al.*, (1999), donde analizaron la partición

de la variación genética dentro y entre nueve poblaciones de la Amazonia Peruana, encontrando que la mayor variación (95%) es entre individuos dentro de las poblaciones.

En RAPD y también en Inter-simple sequence repeats (ISSRs), se encontró un estudio en una especie de la misma familia Rubiaceae (*Psychotria acuminata*), en 51 accesiones provenientes de 4 poblaciones de Costa Rica. Usando 16 cebadores y tres ISSRs obtuvieron 70 y 15 loci polimórficos respectivamente, los cuales fueron capaces de determinar alta variabilidad genética entre las 4 poblaciones. Pero que no pudieron ser explicados ni por los factores climáticos, ni por las distancias geográficas analizadas en este estudio.

3.9.8. Usos de la Biotecnología en los Recursos Genéticos Forestales

La Biotecnología, es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad. Incluye los métodos convencionales de fitomejoramiento y cultivo, ofrece una serie de técnicas de laboratorio como cultivo de células y micropropagación, selección genómica *in vitro*, conservación *in vitro* y gran número de nuevas tecnologías en el campo de la genética molecular, que en las últimas décadas han sido de gran interés científico y comercial, utilizadas para superar las limitaciones biológicas convencionales debidas a las grandes dimensiones de los árboles y a los procesos sexuales retardados comunes a las especies leñosas (Sánchez *et al.*, 1999).

Según Martínez *et al.*, (2003), la biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la silvicultura para cumplir dos objetivos básicos de la gestión forestal actual, como son:

- El mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación y utilización de los recursos genéticos.
- El mejoramiento genético en plantaciones forestales, ya que a medida que aumenta la población y sus demandas de productos forestales, las

tierras disponibles para la producción disminuye, por lo que se necesitan esfuerzos coordinados para conseguir la sostenibilidad de la producción forestal.

Este autor advierte que aunque los sistemas tradicionales de silvicultura y mejoramiento genético continúan siendo importantes en las actividades forestales actuales, los programas convencionales de mejoramiento genético se ven limitados por el largo ciclo de desarrollo de los árboles forestales y la dificultad para distinguir siempre entre la expresión genotípica y los efectos ambientales. Por esto, la biotecnología ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales del mejoramiento genético forestal, como los avances importantes de la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la biología molecular que han tenido lugar en las tres últimas décadas. Actualmente se desarrollan campos en la crioconservación y la regeneración masiva de plantas (expresión de la totipotencia celular), los marcadores de ADN, la genómica de árboles y la transformación genética.

En el ámbito de los recursos genéticos, los marcadores de ADN permiten caracterizar la naturaleza, amplitud y distribución de la variabilidad genética de especies vegetales, y por tanto, este autor considera que facilitan la toma de decisiones sobre qué y cómo preservar.

En la actualidad, resulta clara la importancia de conocer los componentes de la biodiversidad para definir estrategias y planificar las acciones sobre su conservación y uso sostenible. En este sentido, México posee información biológica de buena calidad, sobre todo, en lo referente a la calidad de ecosistemas, al número de especies presentes en el país y su distribución. Sin embargo, existen grandes lagunas en cuanto a la conservación y diversidad genética y es aquí donde la investigación biotecnológica podría participar coadyuvando a identificar, proteger, conservar y multiplicar diversas especies importantes para el país (SEMARNAT/PROCYMAF, 2000).

IV- MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias y Tecnología de la UNAN- León, por medio de marcadores RAPDs.

4.1 Material vegetal

El estudio se realizó con 117 individuos correspondientes a seis poblaciones naturales de *C. candidissimum*. Para la colecta de material biológico se consideró la distribución geográfica de la especie en el país. Por lo que se muestrearon las siguientes localidades Volcán Cosigüina(Chinandega), Refugio de Vida Silvestre La Flor(Rivas) y Volcán Momotombo, El Sauce, Mina El Limón y León en el Departamento de León. No se muestreó en la Isla de Ometepe, debido principalmente al alto costo económico. En las poblaciones muestreadas se utilizó una distancia mínima de 100m entre árboles colectados, para disminuir el grado de parentesco. El número promedio de árboles muestreados fue de **19.5** por población (rango **17-21** individuos) (**ver tabla 4**). La distancia geográfica mínima entre poblaciones fue de **25.70km.**,(**ver tabla 5**). Para detallar los puntos de recolección de las muestras se utilizó un mapa generado por ArcView GIS 3.0 (**ver figura 6**).

La colecta de material vegetal se realizó con ayuda de tijeras telescópicas, debido a la altura de los árboles. Se cortaron hojas jóvenes observándose que no se encontraran dañadas las que se guardaron en bolsas plásticas que contenían sílica gel para su deshidratación (**figura 7 anexos**). Cada bolsa con las muestras fue debidamente rotulada con el lugar, fecha y número de la muestra. A las muestras se les cambió el desecante cada dos días para una mejor deshidratación, los cuales finalmente fueron almacenados a -20°C.

Las poblaciones naturales fueron debidamente georeferenciadas(**ver tabla 4**),se tomaron datos morfológicos a cada árbol(altura, diámetro a altura al pecho, cobertura forestal) para un posible próximo estudio con marcadores morfológicos, cuyos resultados puedan ser comparados posteriormente con los obtenidos con marcadores moleculares.

Procedencia	Departamento	Coordenadas UTM	Altitud (msnm)	Número de muestras
V. Cosigüina	Chinandega	435915.27 E 1439936.78 N	48	17
Refugio de Vida Silvestre La Flor.	Rivas	631154.54 E 1235709.63 N	41	17
V. Momotombo	León	554145.60 E 1377746.90 N	123	21
El Sauce	León	554755.57 E 1415018.07 N	213	21
Mina el Limón	León	530617.10 E 1405777.82 N	58	21
León	León	518993.52 E 1366600.53 N	123	20

Tabla 4. Información de la cantidad y procedencia de las muestras de *C. candidissimum*(Vahl) DC.

	La Flor	Momotombo	El Sauce	Mina el Limón	León
Cosigüina	283.00	133.66	121.49	100.92	111.02
La Flor	X	162.95	195.33	197.63	174.75
Momotombo		X	36.69	36.30	36.91
El Sauce			X	25.70	60.49
Mina el Limón				X	40.96

Tabla 5. Distancia Geográfica (km) entre las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum* (Vahl) DC.

4.2. Extracción de ADN

Para la extracción del ADN se utilizó el protocolo propuesto por Saghai-Marooft *et al.*, (1984), con algunas modificaciones.

En un tubo eppendorf de 2ml, se pesaron 0.04g de tejido pulverizado, al que se le agregó 1 ml de buffer de extracción (TRIS HCL 1M pH=8, EDTA 0.5M, NaCl₂

5M, CTAB 2%, PVP 1%, β -mercaptoetanol) y se incubó a 60⁰C por 1 hora en baño maría, con agitaciones cada 10 min; se dejó enfriar, para agregarle un volumen de cloroformo alcohol-isoamílico (24:1), se mezcló durante 5 min por inversión y se centrifugó a 11000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. El sobrenadante, donde se encuentran en suspensión los ácidos nucleicos, se pasó a un nuevo tubo eppendorf (1.5 ml) donde se le agregó ½ vol. de NaCl 5 M y se mezcló por inversión, luego, se precipitó con 2 vol. de isopropanol frío, se agitó por inversión, dejándose a -20⁰C por 1 h. Se centrifugó en las mismas condiciones pero a 4⁰C. Se descartó el alcohol y el sedimento se lavó primeramente con 500 ml de **lavado I** (etanol absoluto, acetato de sodio 2.5M) por 15 min a temperatura ambiente. Se precipitó de nuevo el ADN por centrifugación en las condiciones mencionadas anteriormente. El sedimento se lavó con 250 μ l de **lavado II** (etanol absoluto, acetato de amonio 1M) en iguales condiciones de lavado y centrifugado. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente por 15 min. Luego se resuspendió el sedimento con 100 μ l de TE (TRIS HCl 10 mM y EDTA 1 mM), y se conservó a -20⁰C.

Finalmente, para eliminar el ARN de las muestras se añadió 2 μ l de ARNasa por cada 100 μ l de ADN, incubándolo en baño maría a 37⁰C por 15 min y conservándolo nuevamente a -20⁰C.

4.3. Chequeo, cuantificación y dilución de ADN extraído

El chequeo cualitativo de la extracción de ADN se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa (0.8 % de agarosa fundida en 50 ml. de TAE 1X). Se colocaron dos peines en la cubeta que contenía el gel para la formación de los pocillos. En cada pocillo se vertió 10 μ l de ADN, más 2 μ l de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xileno cianol y 30% de glicerol), se dejó migrar a un voltaje de 90V / 30min. Luego se sumergió el gel en una cubeta con bromuro de etidio a una concentración de 0.5 μ g/ml por 30 min, para visualizar y fotografiar el gel bajo luz UV.

Para el chequeo cuantitativo se utilizó la espectrofotometría. Para este proceso, las muestras se diluyeron con un factor de dilución de 200 (5 µl de la muestra y 995 µl de agua destilada) y se depositaron en cubetas de cuarzo para determinar la concentración de ADN en un espectrofotómetro Lambda EZ201 UV/V Perkin Elmer, a una absorbancia (Abs) de 260 nm. La concentración se calculó con la fórmula siguiente:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g/ml}) = \frac{(A_{260} \times 200 \text{ (factor de dilución)} \times 50 \mu\text{g/ml})}{1000}.$$

Conocida la concentración del ADN extraído, se prepararon diluciones en buffer TE a 5 ng/ µl y se conservaron a – 20°C.

4.4. Amplificaciones RAPDs

Inicialmente se ensayaron diferentes condiciones de amplificación en tres muestras tomadas al azar del total a estudiar. Para ello se variaron diferentes tiempos y temperaturas hasta elegir las adecuadas, que produjeran marcadores deseables en número e intensidad.

Mezcla de reacción de amplificación

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).

Programa de Amplificación

Cada tubo de PCR conteniendo la mezcla de reacción se colocó en un Termociclador AmpliTron® II Thermolyne programado para una desnaturalización inicial de 3 min a 92°C, seguida por 45 ciclos de:

- Desnaturalización 30 segundos 92°C
- Hibridación 2 min a 37°C
- Elongación 1 min 72°C

Y una elongación final de 8 min a 72°C.

4.4.1. Chequeo de amplificación

A la mezcla de reacción se le adicionó 5µl de tampón de carga para depositarla en los pocillos del gel de agarosa al 1.4% sumergido en un tampón de TAE 1X. Además se colocó en el primer pocillo 10 µldemarcador de ADN de peso molecular conocido 50 -10,000pb. Se realizó la electroforesis a 5V/cm y a continuación se tiñó el gel sumergiéndolo en una cubeta conbromuro de etidio0.5 mg/ml por 30 min. Luego se colocó el gel sobre una lámpara UV (260 nm) para visualizar los fragmentos de ADN.

Una vez determinado el programa, se procedió a seleccionar los cebadores a utilizar con todos los individuos muestreados. Se probaron en total81 cebadores en las tres muestras de ADN, de los cuales ocho fueron elegidos, ya que generaron diferentes patrones de bandas entre las muestras ensayadas (polimorfismo)(**ver tabla 6**).

Cebador	Secuencia 5'→3'
A-04	AATCGGGCTG
F-01	GAGGCCCGTT
T-08	TGAGTGGGTG
BC-411	ACGGATCCTG
I-09	TGGAGAGCAG
U-05	CCTCTGACTG
C-18	AACGGCGACA
S-02	TTGGCGGCCT

Tabla 6. Secuencia de ocho cebadores seleccionados para el estudio total de las 117 muestras de *C. candidissimum*(Vahl) DC. con la técnica RAPD.

4.5. Análisis de datos

Con el patrón de bandas obtenido con la separación de los diferentes fragmentos amplificados durante la electroforesis, se construyó una matriz binaria presencia-ausencia, donde "1" indica la presencia de banda, "0" ausencia y "2" como datos perdidos. Esta matriz se analizó 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 (NumericalTaxonomic and MultivariateAnalisysSystem) (Rohlf, 2005).

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

El árbol de *Neighbor-Joining* se calculó con el programa NEIGHBOR mediante el programa NTSYS 2.20 (Rohlf, 1998 citado por Lanteri-Cigliano, 2006) siguiendo una secuencia de opciones similar a la empleada en el caso de los fenogramas, pero con la condición de que para obtener la matriz de distancia, se debe seleccionar algún coeficiente de distancia genética, como el de Nei(1972).

V- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Condiciones actuales de las poblaciones muestreadas de *C. candidissimum* de Nicaragua.

Durante la colecta de material vegetal para este estudio, se pudo observar que las poblaciones de madroño se encuentran muy deterioradas, debido a la alta extracción para leña, por lo que en general las poblaciones están representadas por árboles jóvenes y aislados. En la población colectada como Volcán Cosigüina, los árboles se encuentran dispersos y presentaron el menor diámetro altura de pecho (DAP) de todas las poblaciones. En El Refugio de Vida Silvestre La Flor en Rivas, parte de las muestras se obtuvieron de la reserva natural, donde se encuentran árboles jóvenes, pero al no haber muchos se terminó la colecta en los sectores aledaños con árboles maduros. Por el contrario, en la tercera reserva natural muestreada, Volcán Momotombo, se obtuvo la mejor colecta, ya que en las faldas del cerro, su presencia es más numerosa, son árboles adultos con mayor altura y diámetro de altura de pecho con respecto a las demás poblaciones muestreadas. Las poblaciones de León, El Sauce y Mina El Limón presentaron árboles aislados maduros y jóvenes, en potreros, en patios de las casas; y en muy pocas escuelas donde han sido plantados con fines ornamentales. Estas poblaciones presentaron un DAP intermedio.

En el Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG-BSF) del INAFOR, existe un ensayo de procedencia del cual se perdieron los registros de su origen, datos necesarios para que tenga valor como conservación *ex situ*. A pesar de la importancia de esta especie como combustible, principalmente para la población de escasos recursos, no existe ninguna plantación para este fin, aunque Cordero (2003), menciona que sí se han establecido plantaciones para leña en Nicaragua, pero no especifica los lugares.

A través de la colecta realizada en las diferentes poblaciones muestreadas logramos obtener datos morfológicos para evaluar de manera general en que

poblaciones se encontraban los árboles más frondosos, obteniendo como resultado que los mayores porcentajes de altura y diámetro (DAP) están en la población de Momotombo, siendo esta un área protegida y con pocos senderos de entrada lo que imposibilita la extracción del recurso, a diferencia de los árboles de zona fragmentada encontrados en León (**ver tabla 7**).

	Diámetro altura de pecho (cm.)	Altura (m)	Diámetro cobertura (m)
Cosigüina	22.8	13.83	9.18
La Flor	31.25	12.85	9.81
Momotombo	47.3	15.59	12.77
El Sauce	31.49	11.5	8.45
M. El Limón	31.47	11.77	8.45
León	25.95	10.76	8.32

Tabla 7. Medidas morfológicas de los árboles colectados de *C. candidissimum*, correspondientes a las seis poblaciones muestreadas.

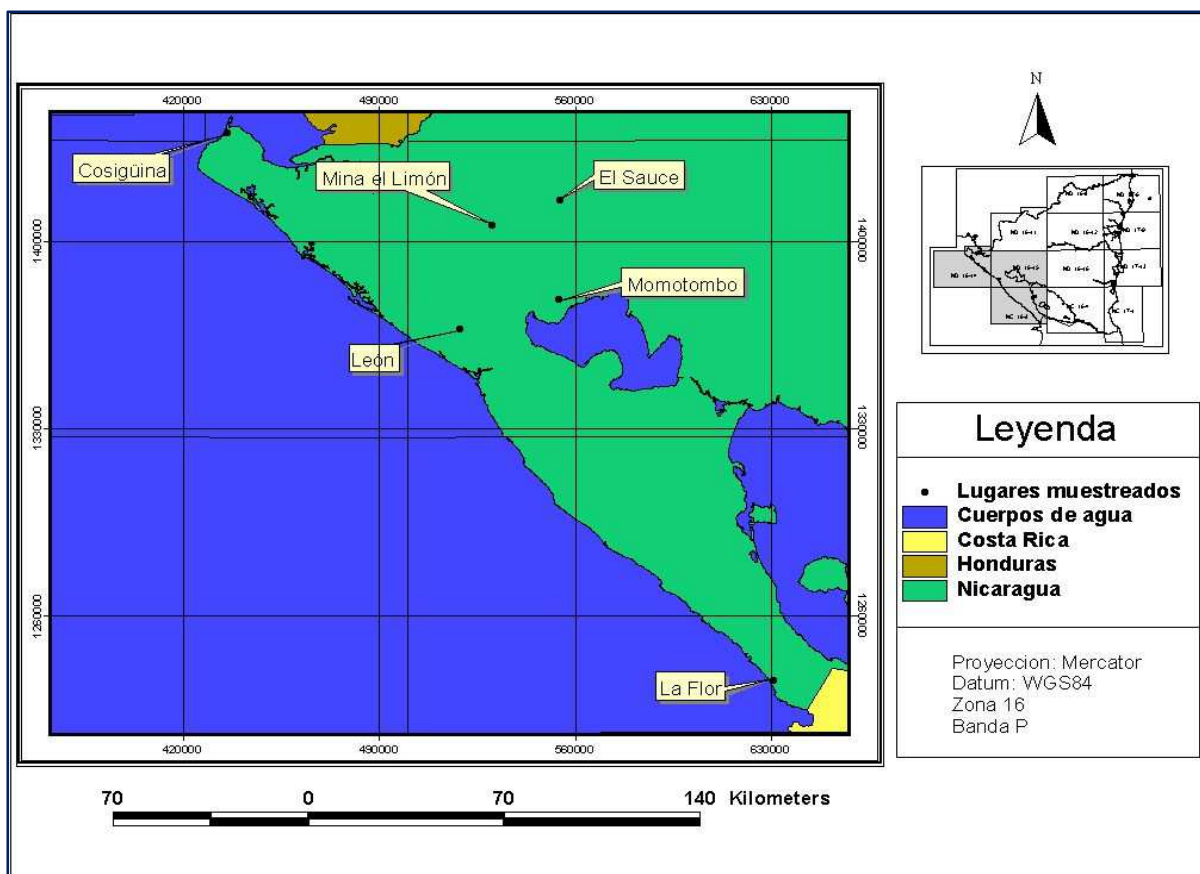


Figura 6. Ubicación de poblaciones muestreadas de *C. candidissimum*(Vahl) DC. en Nicaragua.

5.2. Extracción de ADN

En el proceso de extracción del ADN, se obtuvieron sedimentos de color amarillo y de consistencia aceitosa, los que probablemente fueron producidos por un contaminante polisacárido u otro compuesto formando complejo con éste. Se ha reportado (Terán y Jehizon, 2006) que las Rubiáceas producen alcaloides que se encuentran normalmente acumulados en las hojas y aunque aún no se determina que tipo de alcaloide es, podría haber coprecipitado también con el ADN. Este problema se superó al sustituir el SDS, uno de los componentes del buffer de extracción, por el CTAB. Aunque los dos son detergentes utilizados con el mismo propósito, el CTAB se caracteriza por precipitar los ácidos nucleicos y mantener las proteínas y los polisacáridos neutros en la solución. Posterior al tratamiento con CTAB, se obtuvieron

bandas fuertes y bien definidas, lo que evidencia ADN de calidad y en suficiente cantidad, superior en todos los casos a la banda de mayor peso molecular del marcador de PM(ver figura 8).

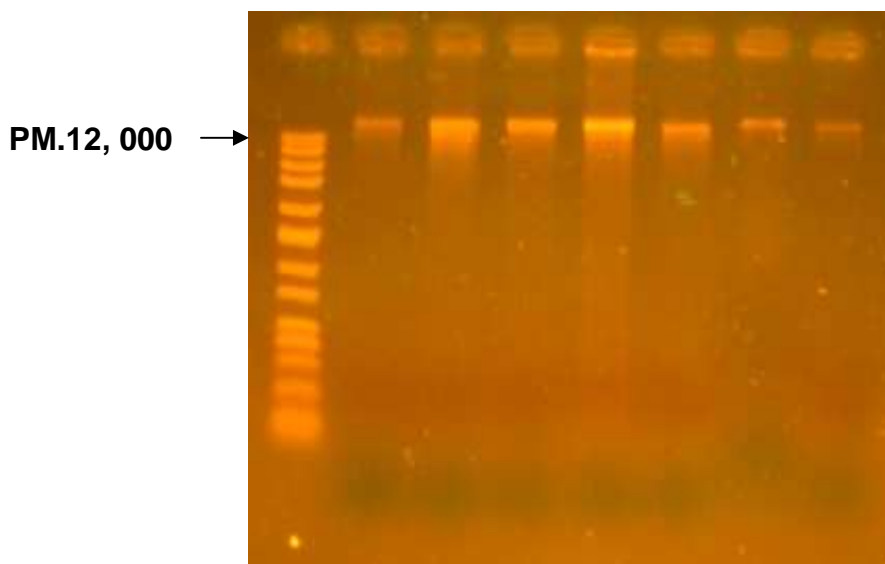


Figura 8.ADN de *C. candidissimum* extraído en el Laboratorio de Genética Molecular UNAN-León en muestras de la población de El Sauce.

5.2.1. Análisis de Patrones de bandas

Para aplicar la técnica RAPD en las muestras de *C. candidissimum*, inicialmente se ensayaron todos los cebadores en existencia en el Laboratorio de Genética Molecular (81 cebadores) en tres muestras escogidas al azar. De éstos se seleccionaron ocho que presentaron bandas bien definidas, con suficiente intensidad y que revelaron polimorfismo entre los individuos analizados. Los ocho cebadores seleccionados produjeron un total de 83 bandas en las 117 muestras estudiadas, de las cuales 28 resultaron monomórficas y 55 polimórficas. El número de bandas generadas con los ocho cebadores varió entre seis (S-02) a 14 (T-08). El promedio de bandas por cebador fue de **10.37**(ver tabla 8). El peso molecular de las bandas obtenidas varió con tamaños entre 400 -2,500 pares de base (pb)(ver tabla 9).

Cebador	Secuencia 5' → 3'	Total de bandas	Bandas monomórficas	Bandas polimórficas
A-04	AATCGGGCTG	10	2	8
F-01	GAGGCCCGTT	13	6	7
T-08	TGAGTGGGTG	14	4	10
BC-411	ACGGATCCTG	10	4	6
I-09	TGGAGAGCAG	10	4	6
U-05	CCTCTGACTG	9	4	5
C-18	AACGGCGACA	11	3	8
S-02	TTGGCGGCCT	6	1	5
	Total	83	28	55
	Media	10.37	3.5	6.87

Tabla 8. Cebadores utilizados, número total de bandas, número de bandas polimórficas y monomórficas.

Cebador	Peso (pb)
A-04	400- 1570
F-01	600 -1400
T-08	400 -1560
BC-411	550- 1560
I-09	600- 1400
U-05	600- 1300
C-18	470- 2500
S-02	450- 1300

Tabla 9. Tamaño de bandas obtenidas (rango en pb) con los cebadores seleccionados.

Los cebadores que produjeron mayor número de bandas polimórficas fueron T-08 con 10 bandas, A-04 y C-18 con ocho bandas cada uno, teniendo los restantes cebadores un promedio de 6.16 bandas.

Generalmente, durante la amplificación se generan tanto bandas bien definidas e intensas como débiles y difusas. Al elegir las de mejor calidad, la interpretación de los datos es más fiable, dado que la presencia como la ausencia de bandas es bastante evidente y no se genera duda a la hora de seleccionar las que forman parte de los datos a analizar.

El cebador T-08 es el que generó mayor número de bandas y también mayor número de bandas polimórficas (**ver figura 9**). Igual resultado se presentó en el estudio realizado por Cerda (2007) en *Pinustecunumanii*. El número de bandas polimórficas que produce un cebador es independiente del número total de banda ya que el número de bandas obtenidas es producto del número de veces que el cebador encontró secuencia complementaria en el ADN de madroño. El hecho de que las bandas sean de diferentes tamaños (posiciones, que es indicador de polimorfismo) es debido a la diferencia en distancia en la que se ubica el cebador en las dos hebras complementarias y que genera productos de diferentes tamaños, aunque con esta técnica se desconoce si la banda que aparece en un determinado sitio, corresponde a una región del genoma o a más de una que por ser del mismo tamaño aparecen en la misma posición en el gel. Por lo tanto, se pueden encontrar cebadores que producen el mayor número de bandas totales, pero que no detectan mayor polimorfismo, como en el trabajo realizado por Díaz (2001) en *Pinusoocarpa* donde de 11 bandas sólo tres resultaron polimórficas y de 14 bandas cinco resultaron polimórficas.

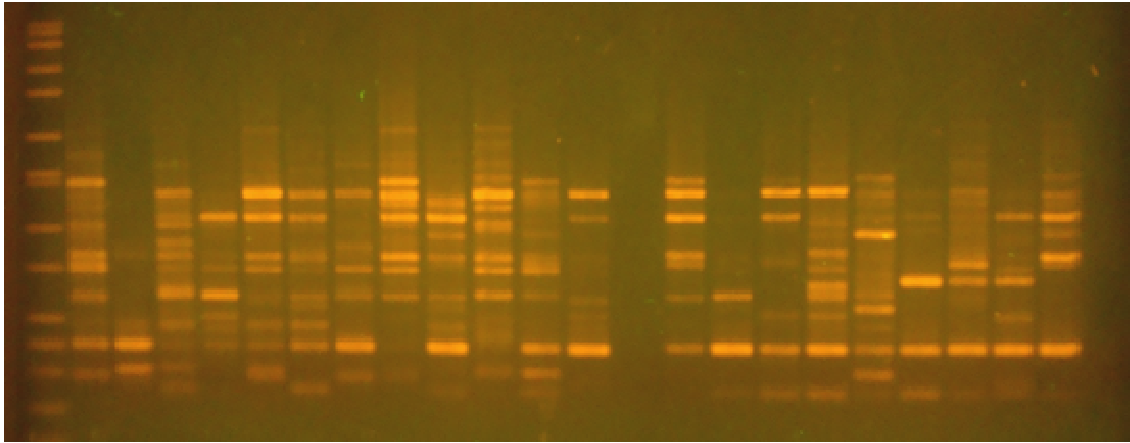


Figura 9.Productos de amplificación RAPDs con el cebador T-08, población Mina El Limón.

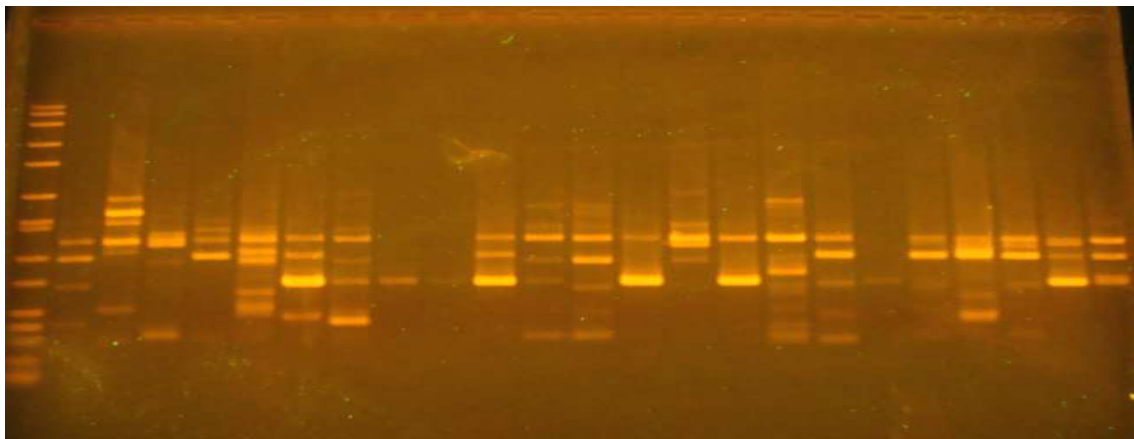


Figura 10.Productos de amplificación RAPDs con el cebador S-02, en la población de León.

Los 55 marcadores polimórficos generados a partir de los ocho cebadores representan el 66.26% y los 28 monomórficos un 33.73%, lo que constituye un indicador de la cantidad de variabilidad genética presente en estas poblaciones. Estos resultados se pueden considerar preliminares puesto que deben incluirse mayor número de cebadores, para obtener información más categórica al respecto.

La mayoría de los trabajos publicados en los que se utiliza la técnica RAPD para análisis poblacional incluye un promedio de 10 cebadores (Díaz, 2001), principalmente cuando los cebadores utilizados generan pocas bandas. Sin embargo se han reportado trabajos realizados con menor número de cebadores citados por Guido (2005) como Chalmers *et al.*, (1994) con seis cebadores, Dawson *et al.*, (1994); con cinco cebadores e incluso el de Guido con seis cebadores de los cuales obtuvo 42 bandas. También en otro estudio realizado por Vásquez y Abdon (1998) en México con caoba (*Swieteniamacrophylla* King), el número total de cebadores utilizados fue de 10, de los que obtuvo 28 bandas polimórficas, por lo que el autor recomienda utilizar mayor número de marcadores que permitan obtener estimaciones más precisas sobre la diversidad genética en esa especie.

Al obtener la frecuencia de bandas polimórficas y el porcentaje de polimorfismo generado en las seis poblaciones muestreadas con todos los cebadores y por cebador con cada una de las poblaciones, se puede observar que la frecuencia de bandas polimórficas es por lo general diferente en cada una de las procedencias (**ver tabla 10**). Las poblaciones que presentaron mayor porcentaje de polimorfismo fueron: El Sauce con 62.65%, Cosigüina con 60.24% y Mina el Limón con 59.04%; seguidas de La Flor y León, ambas con un 57.83% y la población que presentó el menor porcentaje de polimorfismo fue Momotombo con 50.60% (**ver figura 11**), a pesar de ser la población más grande y mejor conservada por encontrarse en un área privada. Esto puede ser debido a que quizás la población haya pasado en algún momento de su historia por un cuello de botella o reducción drástica del tamaño de su población, lo cual puede ocurrir por desastres naturales, tala indiscriminada. Aun cuando las poblaciones pueden recuperar su tamaño original, el efecto de la deriva genética durante el cuello de botella permanece (Uvigen, s.f), Puesto que la población se recupera pero a partir de pocos variantes alélicas, algunas de las cuales pueden llegar a perderse por azar. El resultado de la deriva suele ser la pérdida de variabilidad genética, que contrarresta la entrada de variabilidad por mutaciones (Barbadilla, sf).

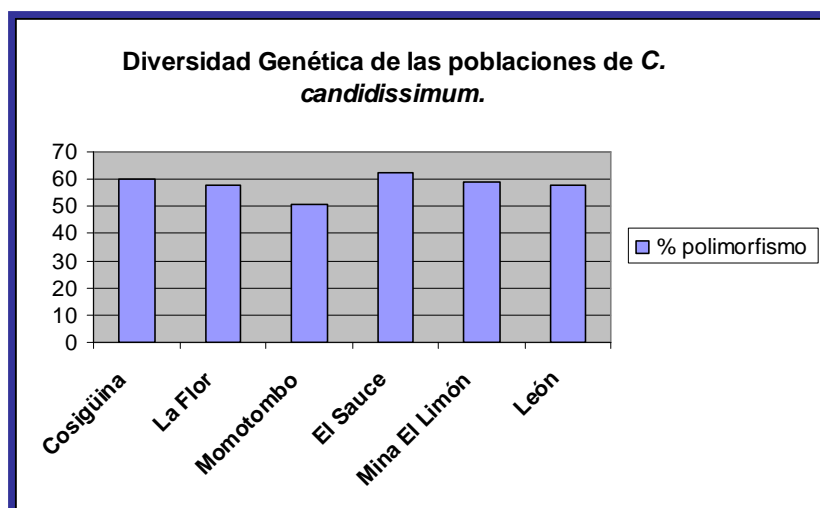


Figura 11. Diversidad genética de las poblaciones de *C. candidissimum*.

Todos los cebadores produjeron bandas polimórficas en todas las poblaciones. Los más efectivos para detectar polimorfismo en cada una de ellas fueron A-04 (76.60%), S-02 (72.16%) y T-08 (71.42%) seguido por C-18 (71.18%). Los que detectaron menor porcentaje fueron el cebador I-09 y BC-411 (48.30%) F-01 (44.85%) y U -05 (31.44 %).

Se puede observar que la mitad de los cebadores utilizados (4) generaron más del 50% del polimorfismo, lo que revela que los cebadores RAPD no son consistentes en revelar polimorfismo, porque existen marcadas diferencias entre ellos, lo que resulta obvio al comparar el número de bandas polimórficas entre los cebadores T-08 (10) y U-05 (5). Resultados semejantes se obtuvieron en el trabajo realizado por Cerda (2007) en *Pinustecunumani* con los cebadores G-10 y R-02. Además, al comparar el número de bandas totales generadas por cada cebador, observamos que son análogos para la mayoría de las poblaciones, principalmente con los cebadores T-08, C-18 y A-04. Nuevamente resultados parecidos se observan en los trabajos de Cerda (2007) y Tijerino (2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser no concluyentes por el pequeño número de marcadores utilizados (55). Si se aumenta el número de cebadores, se haría más selectivo y discriminatorio el estudio, permitiendo un análisis más detallado (Rivera *et al.*, 2009).

Cebador	Cosigüina	La Flor	Momotombo	El Sauce	Mina El Limón	León	Media
A-04	8 (80.00)	7 (70.00)	8 (80.00)	7 (70.00)	8 (80.00)	8 (80.00)	7.66 (76.60)
BC-411	5 (50.00)	6 (60.00)	2 (20.00)	6 (60.00)	4 (40.00)	6 (60.00)	4.83 (48.30)
C-18	8 (72.73)	7 (63.63)	8 (72.73)	8 (72.73)	8 (72.73)	8 (72.73)	7.83 (71.18)
F-01	7 (53.85)	5 (38.46)	2 (15.38)	7 (53.85)	7 (53.85)	7 (53.85)	5.83 (44.85)
I-09	6 (60.00)	6 (60.00)	6 (60.00)	6 (60.00)	3 (30.00)	2 (20.00)	4.83 (48.30)
S-02	4 (66.66)	5 (83.33)	4 (66.66)	5 (83.33)	4 (66.6)	4 (66.6)	4.33 (72.16)
T-08	10 (71.43)	10 (71.43)	10 (71.43)	10 (71.43)	10 (71.43)	10 (71.43)	10 (71.43)
U-05	2 (22.22)	2 (22.22)	2 (22.22)	3 (33.33)	5 (55.55)	3 (33.33)	2.83 (31.44)
Total bandas/ población	50	48	42	52	49	48	48.16 (58.02)
%polimorfismo /población	(60.24)	(57.83)	(50.60)	(62.65)	(59.04)	(57.83)	(58.02)

Tabla 10. Número de bandas y porcentaje (entre paréntesis) de polimorfismo de cada población en estudio con el conjunto de cebadores.

5.3. Relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *C. candidissimum*

A partir de la matriz presencia–ausencia construida con los marcadores RAPDs se obtuvo el análisis de agrupamiento de acuerdo a las distancias genéticas obtenidas por el método de *Neighbor- Joining* del programa NTSYS 2.20. El dendrograma resultante refleja dos grupos diferenciables de las seis poblaciones de *C. candidissimum*(verfigura 12).

Para comparar y analizar estos resultados, se realizó una intensa búsqueda por diferentes medios bibliográficos referente a estudios de diversidad genética para *C. candidissimum*, sin embargo no se encontró ningún tipo de publicación o no ha sido reportado de forma disponible. Encontramos un trabajo de Russel *et al.*, (1999), en *C. spruceanum* con marcadores AFLP, con el cual se realizan algunas comparaciones, puesto que comparte con los RAPD su herencia dominante.

Al relacionar las seis poblaciones de acuerdo a las distancias geográficas y genéticas, tres de las poblaciones del **grupo 1**, El Sauce, Momotombo y Mina El Limón las más cercanas geográficamente también presentan las menores distancias genéticas formando un solo grupo. En cambio, las otras tres poblaciones que se encuentran más distantes geográficamente (León, Cosigüina y La Flor) forman el **grupo 2**, pero no presentan correspondencia entre las distancias geográficas y las genéticas.

Para el **grupo 1** existe concordancia entre las distancias genéticas reflejadas en el dendrograma y sus pequeñas distancias geográficas. Estas poblaciones se pueden considerar homogéneas por que forman parte de una pequeña área geográfica, si se toma en cuenta, que el rango máximo de muestreo entre dos poblaciones es de 283 km. Por lo tanto, se puede suponer que estas poblaciones formaron inicialmente parte de una sola población que evolucionan conjuntamente y producto de la fragmentación que han sufrido se han formado poblaciones pequeñas y separadas físicamente a como se

encuentran actualmente. Sin embargo, aún hay un permanente flujo de genes entre ellas.

Analizando el **grupo 2**, la población de La Flor es la más separada del grupo de las cinco restantes poblaciones muestreadas y presenta la menor distancia genética con respecto a Cosigüina. Esta asociación de relación más cercana genéticamente entre las poblaciones más distantes geográficamente podría deberse que son las únicas poblaciones muestreadas más cercanas al litoral del Pacífico.

La distribución en el dendrograma de todas las poblaciones estudiadas refleja baja proporción de diferenciación genética entre éstas, puesto que se observan valores similares de distancias genéticas entre las mismas, siendo un poco mayor la distancia de la rama que separa los dos grupos formados. Esto sugiere que existe un flujo de genes efectivo entre todas ellas. Resultado similar a este estudio, en cuanto a que un grupo presenta correspondencia geográfica y el otro no, se obtuvo por Russel *et al.*, (1999), en *C.spruceanum* en la Amazonia peruana.

También se obtuvo resultados similares en el trabajo con *C.spruceanum* donde Russell *et al.*, (1999) reportan que el agrupamiento de las poblaciones estudiadas refleja la relativa baja variación genética entre las poblaciones y que el dendrograma no revela una clara relación entre distancias genéticas y distancias geográficas. Igualmente se observa en trabajos realizados en *Pinustecunumanii* por Cerda (2007) y en *Cedrela odorata* por Tijerino (2009).

En otro estudio en *Psychotria acuminata* (Rubiaceae) realizado por Lara *et al.*, (2003), en el que utilizan RAPDs e Inter-simple sequence repeats (ISSR), cuando se comparan las distancias genéticas obtenidas con RAPDs con las distancias geográficas algunas poblaciones con menor separación física coinciden con la de menor distancia genética. Sin embargo, con el marcador ISSR hay mayor concordancia entre las distancias genéticas y las moleculares, dado que los ISSR son marcadores que generan datos más fiables debido a su temperatura

de hibridación con respecto a los RAPDs, por lo que se considera necesario usar mayor número de marcadores con esta última técnica.

De acuerdo a Nybom y Bartish (2000), dendrogramas basados en 120-150 marcadores RAPDs producen una buena representación de las relaciones genéticas entre las poblaciones, porque se obtienen estimados fiables de distancias genéticas. Al emplear mayor número de cebadores que revelen suficientes polimorfismos se establecerán mejor las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de madroño estudiadas, además que permitirá utilizar con estos datos RAPDs programas informáticos específicos para realizar cálculos de Diversidad Genética intrapoblacional (Fenotípica (H_j) y Génica (H_g), e interpoblacional (fenotípica, AMOVA), entre otras

En el trabajo anteriormente citado de *C. spruceanum*, reportan el efecto de la hidrocoria en la dispersión de semillas la cual contribuye significativamente al flujo de genes entre las poblaciones de la Amazonia Peruana.

Por lo poco publicado sobre la biología reproductiva y por otras publicaciones sobre la familia y el género al que pertenece el madroño se conoce que, la dispersión de la semilla se da por el viento (anemocoria) ya que ésta es muy pequeña y presenta estructuras aladas propicias para este tipo de dispersión. También es importante resaltar que esta especie forma parte de los 63 árboles melíferos nativos de Mesoamérica y debido a esta característica es una especie polinizada por abejas, tanto silvestres como domesticadas (Arce et al., 2001).

Se requeriría un estudio más completo de la ecología de la especie, (el rol del viento) y los insectos en la distribución del polen, que al parecer pueden ser de mayor importancia para determinar la estructura genética de estas poblaciones.

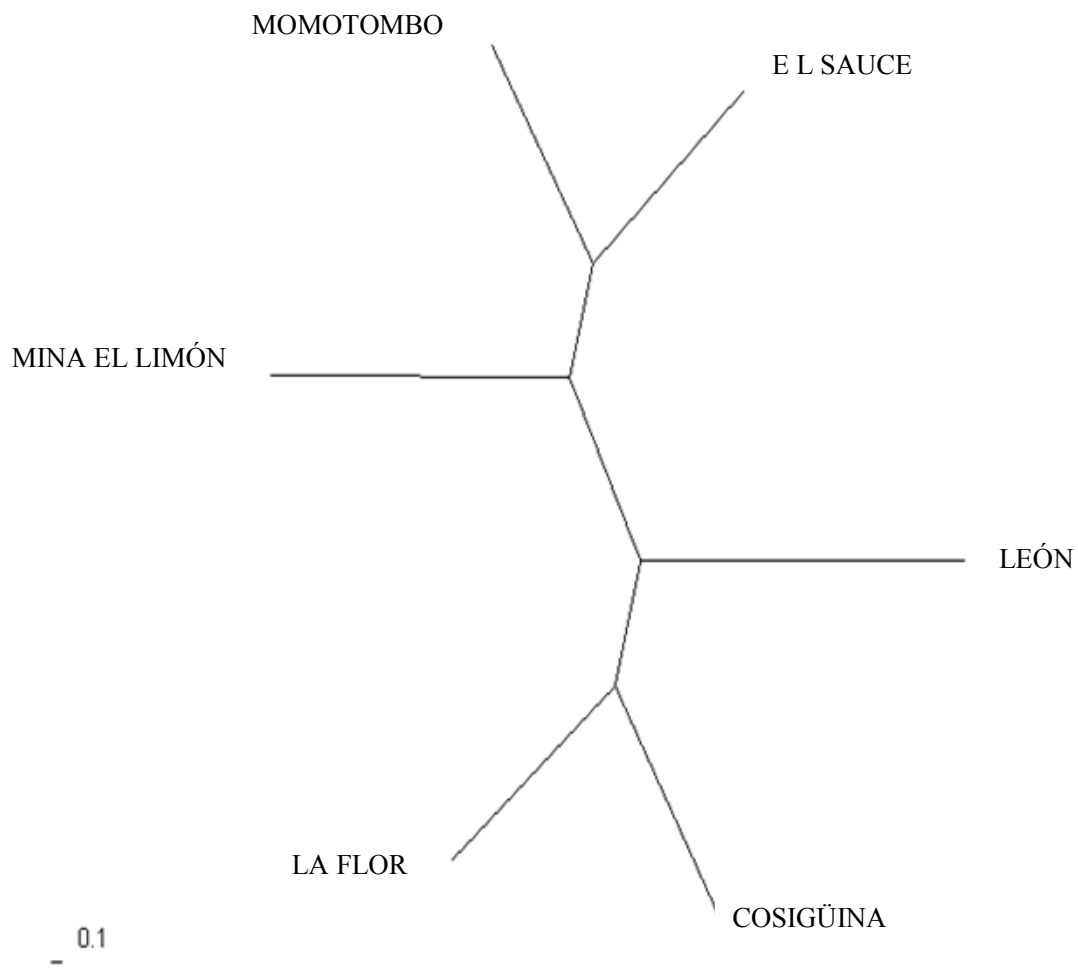


Figura 12. Dendrograma de *Neighbor-Joining* mostrando las distancias genéticas de seis poblaciones de *C. candidissimum* de Nicaragua utilizando marcadores RAPDs. La escala indica una distancia genética de 0.1

VI- CONCLUSIONES

1. Los marcadores RAPDs fueron muy efectivos para la detección de variabilidad genética en *C.candidissimum*, puesto que los ocho cebadores utilizados generaron un total de 83 bandas, de las cuales 55 resultaron polimórficas lo que corresponde a un 66.2%.
2. Los cebadores más eficientes para detectar polimorfismo en las poblaciones estudiadas fueron: A-04 (76.6%), S-02 (72.16%) y T-08 (71.42%).
3. La población de El Sauce presentó el mayor porcentaje de polimorfismo con un 62.65% y el menor lo mostró Momotombo con un 50.60%.
4. El dendrograma obtenido a partir de las distancias genéticas refleja la formación clara de dos grupos. El primer grupo conformado por las poblaciones de El Sauce, Momotombo y Mina el Limón. El segundo grupo lo constituyen las poblaciones de León, Cosigüina y La Flor.

VII- RECOMENDACIONES

1. Adquirir mayor número de cebadores dado que se ensayaron todos los existentes en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN- León y para continuar este estudio, se requieren nuevos cebadores entre los cuales seleccionar los que generen polimorfismo y así aumentar la cantidad de marcadores que permitiría tener resultados más concluyentes.
2. Generar mayor información, de la estructura genética de las poblaciones estudiadas, utilizando software específicos para obtener distintos parámetros de diversidad genética.
3. Incorporar muestras de la Isla de Ometepe, donde se reporta madroño con magníficos ejemplares.
4. Diseñar programas de conservación y recuperación en las poblaciones que han sido o están siendo afectadas en la actualidad, principalmente por la tala indiscriminada.
5. Impulsar programas de concientización y reforestación, donde se inste a la población a sembrar nuestro árbol nacional en lugares como parques, colegios, aceras, patios; con el fin que todos podamos valorarlo y aportemos de esta manera a su conservación.
6. Al INAFOR de acuerdo a los resultados obtenidos con este trabajo, pueda incluir a la especie Madroño en sus programas de mejoramiento genético a través del Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semilla Forestal.

VIII- BIBLIOGRAFÍA

ARCE, H G; Sánchez, LA; Slaa, J; Sánchez-Vindas, P E; Ortiz, A M; W van Veen J; Sommeijer, MJ. 2001. Árboles melíferos nativos de Mesoamérica, Editorial Heredia, Herbario Juvenal Valerio Rodríguez. Costa Rica. 207p.

AZPIROZR, H; CORDOBA A, A I; MARTINEZ R, R; ROJO M, G E; BERNAL L, I O. 2008. Avances de investigación forestal y desarrollo sustentable. México. Disponible en: <http://redesus.files.wordpress.com/2008/12/libro1.pdf>

BARBADILLA, A. s.f. Genética de Poblaciones. Departamento de Genética y Microbiología. Universidad Autónoma de Barcelona Bellaterra. España. Disponible en: <http://bioinformatica.uab.es/divulgacio/genpob.html>

BAWA, FC.S.; BEACH, J.H. 1983. Self-compatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. American Journal of Botany 70(9):1281-1288.

BAWA, FC.S; BULLOCK, S.H.; PERRY, D.R.; COVILLE, R.E.; GRAYUM, M.H. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. II Sexual systems and incompatibility systems. Amer. J. Bot. 72(3):331-345.

CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). 1998. "Calycophyllum candidissimum" *Nota técnica sobre manejo de semillas forestales*. N°. 53, diciembre.

CERDA G, D. 2007. Evaluación de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinus tecunumanii* mediante RAPDS. Monografía Licenciatura. León, Nicaragua, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 33-34 Pág.

CORDERO, J; BOSHIER, D (Eds). 2003. Árboles de Centroamérica. Manual para extensionistas. Turrialba, Costa Rica: CATIE. pág. 431-434.

DEMEY, J. R.; ZAMBRANO F.F. & SEGOVIA V. (2003), [en línea]. Relación entre la caracterización molecular y morfológica en una colección

de yuca. *Interciencia*. 28(12): 684-689.[Consulta: el 17 de octubre del 2008]. Disponible en versión <http://www.Scielo.org.ve/Scielo.php2Script=SCarttext&pid=5037818442003001200004&ing=iso155n0878-1844>.

DÍAZ V, M V. 2001. Caracterización de la diversidad genética de poblaciones naturales de *Pinusoocarpa* de Nicaragua a través de marcadores moleculares. Tesis doctoral, Alcalá de Henares, España, Universidad de Alcalá de Henares, España. pág 127.

DOLMUS, CM; GARCÍA, IB. (2006). Evaluación de la variabilidad genética de *Pachiraquinata* 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.

DUJARDIN J.P; PANZERA F; SCHOFIELD C. J. (s.f.). Triatominae: estructura poblacional y estudios de re-ingestación. Centro de Teleinformática Médica de FAC. Argentina. Disponible en: <http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c001/duja.htm>

FALCONER, D. 1989. Introduction to Quantitative Genetics. 3rd edition. Londres: Longmans Green-John Wiley & Sons.

FAO, CSFD, IPGRI. 2002. Conservación y ordenación de recursos genéticos forestales: en bosques naturales ordenados y áreas protegidas (in situ). pág. 1.

FAO(Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2003. Situación de los bosques del mundo. Utilización y ordenación sostenibles de los recursos de agua dulce: papel de los bosques 100 p.

FAO(Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006. Bosques y Cambio Climático: la función de los bosques

como sumideros de carbono y su contribución al cumplimiento del protocolo de Kioto por parte de España. Foro de bosques y cambio climático.

FAO(Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2008. Informe sobre el Estado de los Estudios Genéticos Forestales en el Mundo.

FERIA NACIONAL DE LA TIERRA. 2008. ABC Cambio Climático. Comité Organizador Permanente VII Feria Nacional de la Tierra. 1ra ed. Managua, Nicaragua.

FONTDEVILA, A; MOYA, A. 1999. Introducción a la Genética de Poblaciones. Editorial Síntesis. Madrid, España. 349 p.

FRANKEL, O.H. 1976. Natural variation and its conservation. Pp. 21-44 in Genetic Diversity in plants (A. Muhammed. R. Aksel and R.C von Borstel, eds.). Plenum Press, New York, USA.

FRANKHAM, R; BALLOU, J; BRISCOE, D.2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, United Kingdom.

FUTUYMA, D. J. 1998. Evolutionary Biology. 3^{ra} ed. Sunderland, Mass, U.S.A, Sinauer Associates. pág. 10.

GALLO L; MARCHELLI P; PASTORINO M; IZQUIERDO F y MARIA MARTE AZPILICUETA. 2005. "Especies forestales nativas patagónicas Programa de Conservación y Utilización de los Recursos Genéticos". *Revista IDIA*. vol. XXI. N° 8. Disponible en:

<http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/forest/genetica03.pdf>

GÓMEZ, M; ECHENIQUE, V. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Capítulo 3: Herramientas Básicas de Ingeniería Genética. Argentina. Instituto nacional de tecnología Agropecuaria. pág. 52-53. Disponible en línea en:

www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap3.pdf

GONZÁLEZ-BENITO M.E., HERRADON E., MARTÍN C., 1999. The development of a protocol for the encapsulation desiccation and in vitro culture of embryonic axes of *Quercussuber* L. and *Q. ilex* L. *SilvaeGenética*, 48: 25-28.

GTZ/FUNDECO/IE. 2001. Estrategia regional de biodiversidad para los países del trópico Andino. Conservación Ex Situ. Documento Temático. La Paz, Bolivia. 129 p.

Disponible en: www.comunidadandina.org/desarrollo/dct3

GUARIGUATA, M R; SÁENZ, G. 2002. Post Logging Acorn Production and Oak Regeneration in a Tropical Montane Forest, Costa Rica. *Forest Ecology and Management* 167: 285-293.

GUARIGUATA; M R. 2009. "El manejo forestal en el contexto de la adaptación al cambio climático". *Revista de Estudios Sociales* No. 32. Bogotá. pág. 98-113.

GUIDO N, D J. 2005. Estudio preliminar de la diversidad genética entre 16 procedencias de *Sabal mexicana* Mart, del pacífico de Nicaragua, aplicando la técnica RAPD. Monografía Licenciatura. León, Nicaragua, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. pág 39-41.

HEINZ, R. 2008. Marcadores Moleculares. Curso de Agrobiotecnología. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires.

IPGRI; CORNELL UNIVERSITY. 2003. Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP). www.ipgri.cgiar.org/training/Unit101/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.3.pdf

KRESS, W.J.; BEACH, J.H. 1994. Flowering plant reproductive systems. In: Mcdade, L.A.; Bawa, K.S.; Hespenheide, H.A.; Hartshorn, G.S. La Selva:

Ecology and natural history of a neotropical rain forest University of Chicago. Chicago. Pp: 161-182.

LANTERI, A; CIGLIANO M . 2006. Sistemática Biológica: fundamentos teóricas y ejercitaciones. 3^{ra} ed. Editorial de la Universidad de la Plata. pág. 166.

LARA, A; VALVERDE, R; ROCHA, O; GÓMEZ, L. 2003. “Variabilidad y diferenciación genética en cuatro poblaciones de la planta medicinal *Psychotriaacuminata* en Costa Rica”. *Agronomía costarricense*. Julio - diciembre. vol. 27 n° 002. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pág. 29-42.

LEE, R. 1980. Foresthydrology. Nueva York, NY, Estados Unidos, Columbia UniversityPress.

LÓPEZ R, F G. 2005. Ecofisiología de árboles. Universidad Autónoma de Chapingo. México. Pág. 21-23, 30-31, 57-78, 461-478.

MARTINEZ R, R., AZPIROZ R, H. S., RODRIGUEZ DE LA O J.L., CETINA A; V.M., GUTIERREZ E; M.A. 2003. “Aplicación de la biotecnología en los recursos genéticos forestales”. *Revista Chapingo*. Enero- junio.vol. 9. n°001. pág. 17-34.

NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.

NYBOM H; BARTISH, I V. 2000.Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. Vol. 3/2, pp. 93 – 114.

PARK Y., S.; BARRET J., D.; BONGA J., M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high- value clonal foestry: deploiment, genetic control and stabilyty of cryopreserved clones: in vitro cellular and Developmental Biology Plant 34:231-239.

PARRY, M; CANZIANI, O; PALUTIKOF, J. 2008. "Conclusiones fundamentales del IPCC en relación con los impactos y adaptaciones del cambio climático". *Boletín de la OMMM*. 57(2). Disponible en:

www.wmo.int/wcc3/bulletin/57_2_en/documents/parry_es.pdf

PICADO, L.C. 1997. Evaluación de la relación genética entre y dentro de cuatro cultivares importados de *Jatropha curcas*, establecidos en el banco de germoplasma en la UNAN-León. Tesis, Lic. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua –León. 51p.

PICCA, A; HELGUERA, M; SALOMÓN, N; CARRERA, 2004. Marcadores moleculares. En Echenique, V. Rubinstein, C; Mroginski, L. eds. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo argentino para la información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina ediciones INTA.pág. 61-68

RAMANATHA, RV; HODGKING, T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *PlantCell, Tissue and OrganCulture* 68: 1-19.

RIBEIRO, N. 1999. Fenología y éxito reproductivo de algunas especies del sotobosque intervenido del norte de Costa Rica. Tesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Costa Rica. pág. 5-6; 8-9; 12.

RIVERA B, R; TORRES, I; GARZÓN, J A; HERRERA L, E.1998. Introducción a la biología molecular e ingeniería genética de plantas. SARH-INIFARP-CINVESTAP. 22 p.

RIVERA J, H J; SUÁREZ P, I E; PALACIO M; J D. Análisis de la diversidad genética de "caña flecha" *Gyneriumsagittatum* Aubl. Utilizando la técnica de AFLP. *Agricultura Técnica en México* [en línea] 2009, 35 (Enero-Marzo): [fecha de consulta: 29 de abril de 2010] Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=60811122008>

ROCAS, A. N. 1980. Reproducción sexual en especies forestales. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo. 69p.

ROCHAS, P J. 2002. “Teoría y práctica para la extracción y purificación del ADN de palma de aceite”. *Revista. Palmas*. n°. vol. n°23 n° 23. pág. 9 – 17.

ROHLF, F.J. 2005. NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.20.Exeter Software.New York.

ROGERS, S.O; **BENDICH**, A.J. 1988.Extraction of DNA from plant tissues.Plant Molecular Biology Manual. A6: 1- 10. Kluwer Academic Publishers, Belgium.

RUSSELL, J. R; **WEBER**, J. C; **BOOTH**, A; **POWELL**, W; **DAWSON**, C. **SOTELO-MONTES** AND **I. K.** 1999. “Genetic variation of *Calycophyllumspruceanum* in the PeruvianAmazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis”. *Molecular Ecology*. vol. 8, n° 2, February, 1999. pág. 199-204.

SAGHAI M, M; **SOLIMAN**, K; **JORGENSEN**, R; **ALLARD**, R. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamic. *Proc.Natl. Acad. Sci.* 81: 8014-801.

SAMBROOK, J; **RUSSELL**, D.W; **SAMBROOK**, J. 2001.Molecular Cloning. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SÁNCHEZ, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial trama. Universidad de Concepción Chile. Chile. 322 p.

SCARIOT, A.O.; **LLERAS**, E. Y **HAY**, J.D. 1991. Reproducive biology of the palm *Acrocomiaacukata* in central Brazil. *Biotropica* 23(1): 12-22.

SEMARNAT/PROCYMAF. 2000. Proyecto de Conservación y Manejo Sustentable de Recursos Forestales en México (PROCYMAF). Balance de tres años de ejecución. pág 29.

SLATKIN, M. 1994. Gene flow and population structure. *Ecological genetics*. Editado por L. Real Princeton. Disponible en:
<http://evolucion.fcien.edu.uy/Lecturas/Slatkin1994.pdf>

SOLÍS R, L Y; ANDRADE T,A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *La ciencia y el hombre*. Enero – Abril. vol. XVIII. n°1

SPOONER, D; R. VAN TREUREN; DE VICENTE; M. C. 2005. “Molecular markers for genebank management”. *Revista IPGRI*. Bulletin. N° 10.

STARR, C; TAGGART,R. 2004. *Biología 2: La unidad y diversidad de la vida*. ed.10. Thomson. pág. 88-89.

STEVENS W.D.et al. 2001. *Flora de Nicaragua*. Missouri Botanical Garden Press.pág. 2,218.

STONE, JX. 1995. Pollen donation patterns in tropical distylous shrub (*Psychotriasuerrensensis*; Rubiaceae). *American Journal of Botany* 82(11): 1390-1398.

SUNDERLIN, W; ANGELSEN,A; BELCHER,B; BURGERS,P; NASI,R; SANTOSO,L; WUNDER,S. 2005. Livelihoods, Forests, and Conservation in Developing Countries: an Overview. *World Development* 33: 1383-1402.

TAYLOR, B.H.; MANHART, J.R.; AMASINO, R.M. 1993. Isolation and characterisation of plant DNAs. In: B.R. Glick; J.E. Thompson. (Eds.). *Method in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. CRC Press. Florida. p.37-47.

TERAN A, J J.2006. Diversidad de la familia Rubiaceae en el Parque Nacional Carrasco (Limbo Palmar y Guacharos). Monografía.Universidad Mayor de San Simón. Bolivia. pág.16-17

Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/diversidad-familia-rubiaceae/diversidad-familia-rubiaceae.pdf>

TIJERINO L, A. 2009. Determinación de la variabilidad genética en cinco poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L. utilizando la técnica RAPDs. Monografía Licenciatura. León, Nicaragua, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 70 pp.

TORIBIO M, CC. 2000. El uso de la biotecnología en la conservación de recursos genéticos forestales. Instituto Madrileño de Investigación Agraria y Alimentaria (IMIA). Disponible en: dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=165054

TRUJILLOL, G. 2004. Desarrollo de marcadores SCAR y CAPS en un QTL con efectos importantes sobre la resistencia al tizón tardío de la papa. Tesis digitales UNMSM. Disponible en: http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2004/trujillo_lg/html/index-frames.html

UENO S., YOSHIMARU H., TOMARU N., YAMAMOTO S. 1999. Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. *Molecular ecology*.8: 335-338.

UVIGEN (Unidad vinculante intradisciplinaria de genética), s.f. Introducción a diferentes temas de genética realizada por el grupo de docentes. Genética de poblaciones: deriva genética. Universidad de la República de Uruguay. Disponible en: <http://uvigen.fcien.edu.uy/utem/Popgen/popder.html>

VÁSQUEZ W, S A. 1998. Estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) del área de Centroamérica y México. Tesis. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica. pág. 43.

WILLIAMS, J GK; KUBELIK, AR; LIVAK, KJ; RAFALSKI, JA; TINGEY, SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.

WILLIAMS, L. A. Y RAMOS, E. D. 2000. Uso de marcadores RAPDs(RandomAmplifiedPolimorphic DNA) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivares de *Jatropha curcas* L. Tesis, Lic. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua – León. 61 p.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and genetics of population.Vol.4. Variability within and among populations. Chicago, US, University of Chicago press. III.

XENA DE ENRECH, N. 2002. “Una década de aplicación del método RAPD: alcances y límites en el estudio de relaciones genéticas en plantas”. *Acta Científica Venezolana*. vol. 51. Pág.197-198. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>

ANEXOS



Figura 1.Árbol de *Calycophyllumcandidissimum*

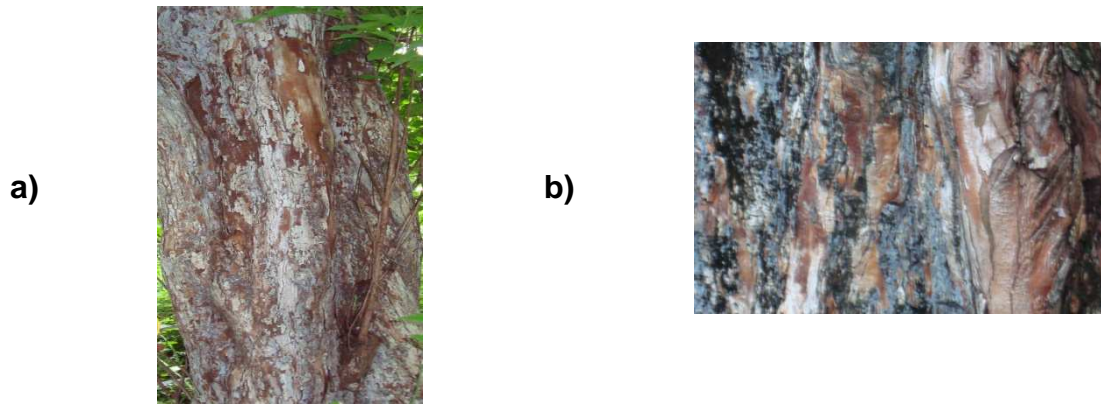
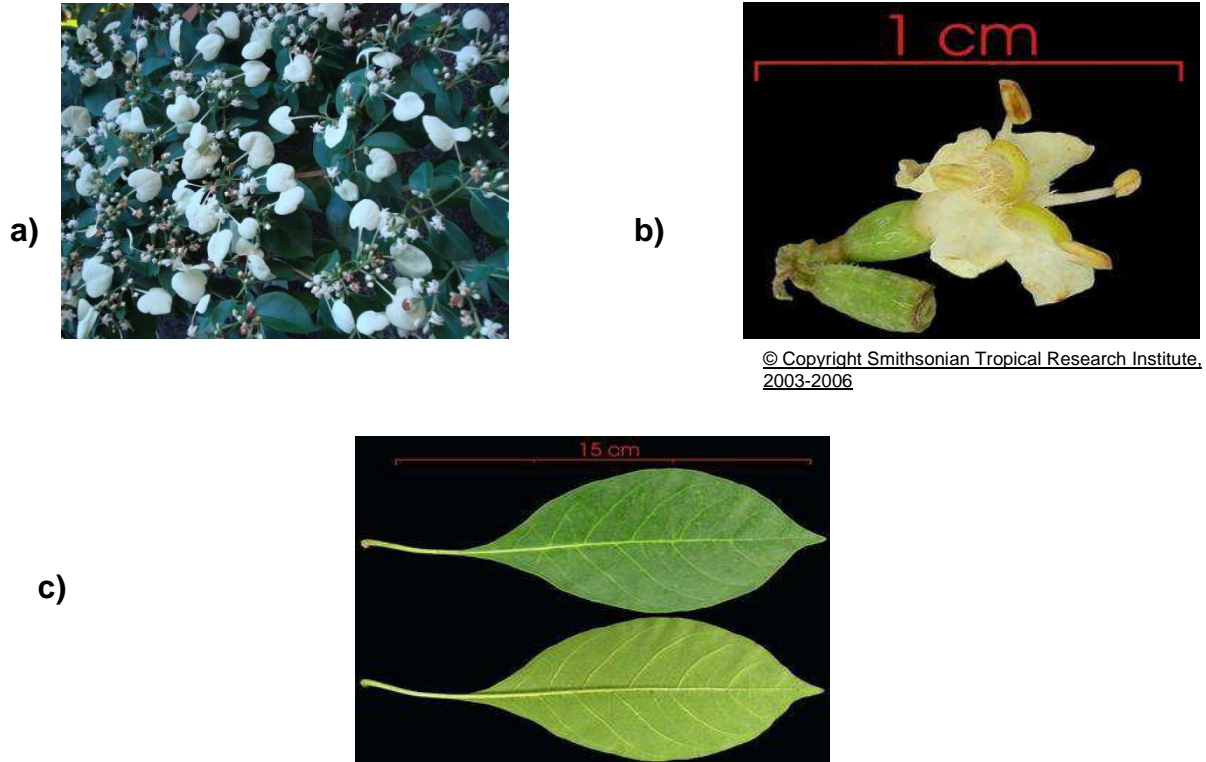
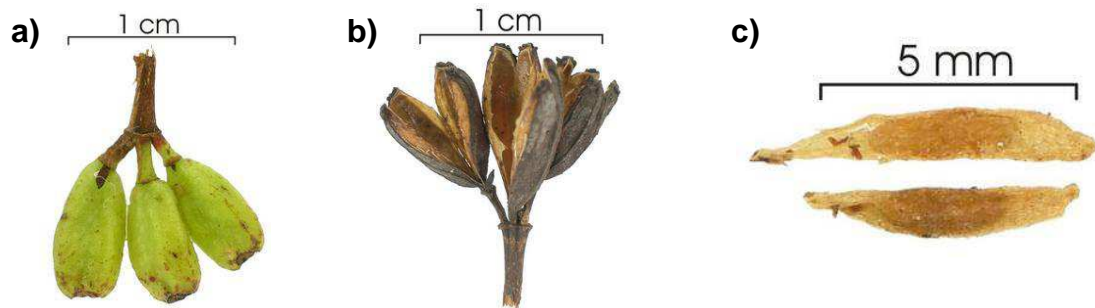


Figura 2. Comparación de la corteza de *C. candidissimum* en estado joven **(a)** y estado adulto **(b)**.



© Copyright Smithsonian Tropical Research Institute, 2003-2006

Figura 3. a) Inflorescencia, b) flor individual, c) hojas de *C. candidissimum*.



© Copyright Smithsonian Tropical Research Institute, 2003-2006

Figura 4.a) fruto verde, b) cápsula seca y c) las semillas secas de *C. candidissimum*.



Figura 6.Deshidratación de las hojas de *C.candidissimum* con sílica gel.