



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
UNAN – LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
“EDGAR MUNGUÍA ALVAREZ”



DETERMINACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA EN CINCO POBLACIONES
NATURALES DE *Cedrela odorata* L. UTILIZANDO LA TÉCNICA RAPD



AUTORA

Br. ARLEN TIJERINO LÓPEZ

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

TUTORA

MSc. LOURDES CALLEJAS
LEÓN, NICARAGUA



DEDICATORIA

A Dios, que me dio la vida y me permitió llegar a este punto.

*A mi madre Lila López
y a mi padre Nelson Tijerino por su incondicional amor y apoyo.*

Y a Lourdes Callejas, Mi tutora por haberme guiado en el desarrollo de este trabajo y llegar a la culminación del mismo.



AGRADECIMIENTOS

Al convenio de cooperación entre la UNAN-León y el INAFOR que a través del **Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales** financió la realización de este trabajo, por medio del Proyecto Marcadores 2007-2008, y a la **Cooperación Española** por colaborar con el fortalecimiento del equipamiento del Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León. Así mismo, a mi tutora **MSc. Lourdes Callejas** por sus enseñanzas y consejos los cuales me ayudaron en la realización de este trabajo. A **la Ph.D. Verónica Díaz** quien me acompañó en la colecta de muestra y quien me brindó sus conocimientos cuando los necesité.

Agradeciendo también al **Lic. David Cerda**, por ayudarme en la colecta de muestra lo que hizo menos difícil las largas horas de viaje, así mismo, por su asesoría en el procesamiento de datos para el análisis estadístico de este trabajo. A **José López Hernández** por su ayuda en la colecta y a todas las personas que conocí en los lugares de colecta de muestra.

Especiales reconocimientos a todas aquellas personas que de alguna y otra manera contribuyeron a la realización de este trabajo, aquellas que me brindaron su amistad y las cuales me ayudaron a culminación exitosa de mi carrera.

Gracias.....



ÍNDICE

LISTA DE TABLAS.....	vi
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. MARCO TEÓRICO.....	6
3.1 GENERALIDADES DE <i>Cedrela odorata</i> L.....	7
3.1.1. Taxonomía.....	7
3.1.2. Descripción.....	8
3.1.3. Distribución y Ecología.....	10
3.1.4. Características Biológicas.....	10
3.1.5. Ciclo Reproductivo de <i>Cedrela odorata</i> L.....	11
3.1.6. La <i>Hypsipyla</i> , principal amenaza para las Meliaceae.....	11
3.1.7. Situación actual de <i>Cedrela odorata</i> L.....	12
3.1.8. Diversidad genética de las plantas.....	15
3.2 BASES GENÉTICAS DE LA VARIACIÓN.....	15
3.2.1. Genética de Poblaciones.....	15
3.2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	17
3.2.3. Mutación.....	18
3.2.4. Flujo de genes.....	21
3.2.5. Deriva genética.....	21
3.2.6. Cuello de Botella.....	22
3.2.7. Efecto fundador.....	22
3.2.8. Apareamiento no aleatorio.....	23
3.2.9. Selección natural.....	23
3.3 PRESERVACIÓN Y PROMOCIÓN DE LA VARIABILIDAD.....	24
3.3.1. Reproducción sexual.....	24
3.3.2. Mecanismos que promueven la exogamia.....	24
3.3.3. Diploidía.....	25
3.3.4. Superioridad de los heterocigotos.....	26
3.4. MARCADORES GENÉTICOS.....	27
3.4.1. Marcadores Morfológicos.....	28
3.4.2. Marcadores Moleculares.....	28
3.4.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA).....	31
3.4.4. Diversidad genética en Meliaceae detectada por marcadores RAPDs.....	33



IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	36
4.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	38
4.2.1. Protocolo.....	38
4.2.2. Chequeo y cuantificación del ADN extraído.....	40
4.3. AMPLIFICACIONES DE ADN CON LA TÉCNICA RAPD.....	40
4.3.1. Selección de cebadores.....	40
4.3.2. Preparación de mezcla de reacción de Amplificación.....	41
4.3.3. Pasos de Amplificación de RAPD.....	41
4.3.4. Chequeo de amplificación.....	42
4.4. ANÁLISIS DE DATOS.....	42
4.4.1. Proporción de Loci Polimórficos.....	42
4.4.2. Diversidad Genética Intrapoblacional.....	43
4.4.2.1. Diversidad Fenotípica (H _j).....	43
4.4.2.2. Diversidad Génica (H _g).....	44
4.4.3. Diferenciación Entre las Poblaciones.....	45
4.4.3.1. Estimación en términos de la Diversidad Fenotípica.....	45
4.4.3.2. Estimación en términos de distancias genéticas. Análisis de la varianza Molecular (AMOVA).....	47
4.4.4. Relaciones Filogenéticas.....	49
V. RESULTADOS DISCUSIÓN.....	51
5.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	53
5.2. AMPLIFICACIONES RAPD.....	53
5.3. Proporción de Loci Polimórficos.....	55
5.4. DIVERSIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL.....	57
5.4.1. Diversidad fenotípica (H _j).....	57
5.4.2. Diversidad génica (H _g).....	59
5.5. DIFERENCIACIÓN ENTRE POBLACIONES.....	62
5.5.1. Estimación en términos de la diversidad fenotípica.....	62
5.5.2. Estimación en términos de distancia genética.....	64
5.5.3. Diferenciación entre pares de poblaciones.....	68
5.5.4. RELACIONES FILOGENÉTICAS.....	70
VI. CONCLUSIONES.....	74
VII. RECOMENDACIONES.....	76
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	72



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de los departamentos de Nicaragua donde se ubican las poblaciones naturales de <i>Cedrele odorata</i> L. muestreadas de este estudio.....	36
Tabla 2. Designación y secuencia de los 31 cebadores ensayados en tres muestras de ADN de <i>Cedrele odorata</i> L. con la técnica RAPD.....	40
Tabla 3. Diseño del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	47
Tabla 4. Designación y secuencia de los cebadores empleados en este estudio.....	54
Tabla 5. Número y porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con RAPD.....	56
Tabla 6. Estimaciones de la diversidad fenotípica intrapoblacional obtenidas con cada cebador (H_j) y los valores medios (H_f) considerando todos los cebadores para cada población con RAPD.....	58
Tabla 7. Valores de polimorfismo y diversidad obtenidas con RAPD en las 5 poblaciones analizadas. Entre paréntesis error típico.....	60
Tabla 8. Diversidad intrapoblacional (H_{POP}/H_T) e interpoblacional (G_{ST}) con 9 cebadores RAPD en las 5 poblaciones muestreadas y los correspondientes valores medios.....	63
Tabla 9. Resultados del análisis de AMOVA en las 5 poblaciones muestreadas de <i>Cedrele odorata</i> L. usando RAPD.....	65
Tabla 10. Valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones obtenidos a partir de RAPD.....	69
Tabla 11. Matriz de distancias genéticas de Reynolds <i>et al.</i> , 1983 obtenidas a partir de RAPD.....	70



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A: corteza de <i>Cedrela odorata</i> L., B: hojas, C: flores.....	9
Figura 2. Mapa indicando las poblaciones muestreadas de <i>Cedrela odorata</i> L. de Nicaragua.....	37
Figura 3. Foto de ADN extraído de 4 muestras de <i>Cedrela odorata</i> L. de la población volcán Casita.....	53
Figura 4. Amplificaciones RAPD con el Cebador OPS-18 en muestras de <i>C. odorata</i> . En la línea 1 se presenta el Marcador de Peso Molecular.....	54
Figura 5. Representación de las estimaciones de diversidad fenotípica y diversidad génica encontrada en marcadores RAPDs en <i>Cedrela odorata</i> L.....	60
Figura 6. Análisis Neighbour-joining (dendrograma) mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de <i>Cedrela odorata</i> utilizando marcadores RAPDs.....	71



LISTA DE ABREVIATURA

A	Absorbancia
AMOVA	Análisis de varianza molecular
AFLP	Polimorfismo para la longitud de fragmentos amplificados.
CMG & BSF	Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales
dNTP	2'-deoxinucleósido 5' trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
gl	Grados de libertad
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
RAPD	ADN polimórfico amplificado al azar
rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Tris acetato EDTA
TE	Tris EDTA
TPFGA	Herramientas para los análisis de genética de poblaciones
Tris	2-amino-2 (hidroximetil)-1-1-3-propanodiol
UV	Ultravioleta
V	Voltio
µg	Microgramo
µl	Microlitro



RESUMEN

Cedrela odorata L. es una especie tropical forestal de gran importancia la cual tiene un amplio rango de distribución en el continente, y es considerada una de las especies principales para producción de madera. Debido a la sobreexplotación, fue incluida en 1998 por la UICN (International Union for Conservation of Nature) en la Lista Roja de Especies como una especie vulnerable. Como la evaluación de la variación genética proporciona un diagnóstico del potencial de adaptación de las poblaciones ante los cambios ambientales, en el presente estudio se evaluó la variabilidad genética en 92 muestras de 5 poblaciones nicaragüenses de *C. odorata* a través de marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA o Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar). Con 9 cebadores utilizados se generaron un total de 78 bandas polimórficas. La proporción de bandas polimórficas de todos los cebadores con todas las poblaciones dio un valor medio de 63.33%. Los valores medios para medir la diversidad intrapoblacional fueron muy similares tanto para la diversidad fenotípica ($H_f=0.339$) como génica ($H_g=0.311$). De acuerdo a los índices de diferenciación se encontró que la mayor diversidad genética esta dentro de las poblaciones (93.1% para $H_{POP}/H_T=0.931$ y 86.19% según AMOVA), que entre las poblaciones (6.9% para $G_{ST}=0.069$ y 13.8% según AMOVA). En el dendrograma obtenido por el método de neighbor-joining se distingue un grupo central formado por las poblaciones Casita, El Refugio, Masatepe y Esquipulas y de manera aislada se presenta la población de La Trinidad. Estos resultados corroboran lo demostrado en otros estudios realizados en especies de árboles forestales perennes y de fecundación cruzada, como es el caso de *Cedrela odorata* L., donde se ha encontrado una positiva asociación entre estas características con la alta variabilidad intrapoblacional detectada por RAPD, por lo que se puede considerar a estas poblaciones naturales una valiosa reserva genética para futuros planes tanto de conservación-reforestación de esta especie.



I

Introducción



El alto valor maderable de *Cedrela odorata* L. ha resultado en su sobreexplotación por más de dos siglos, lo que ha provocado la erosión genética de la especie a través de su distribución natural, a lo largo de casi toda América Tropical y el Caribe. La tala selectiva de los mejores fenotipos o árboles plus (los más altos, los más rectos), deja sólo genotipos inferiores y reduce el fitness (reproducción y sobrevivencia) en las poblaciones remanentes. También hay que tomar en cuenta que *Cedrela odorata* L. es atacado por una plaga barrenadora *Hypsipylla grandella*, y es probable que la eliminación de los mejores fenotipos representa la pérdida de la resistencia a plagas que afectan su crecimiento. Además, la deforestación que aún continúa en muchas partes de su rango de distribución, también constituye una amenaza a las poblaciones remanentes (Cavers *et al.*, 2003a).

Lo citado anteriormente aplica para la situación de *Cedrela odorata* L. en Nicaragua, como se pudo constatar en algunas poblaciones colectadas para este estudio en la zona del Pacífico, así como también en las poblaciones del Municipio del Castillo, Río San Juan según reporta Paniagua, (s.f). En las poblaciones de este estudio no se encontró problemas de *Hypsipylla grandella*, ya que los individuos muestreados están en estado adulto.

La variación genética es la variedad de alelos y genotipos presentes en las poblaciones, especies o grupo de especies (Frankham *et al.*, 2002). Es una condición importante para las especies, ya que les permite enfrentar los retos presentes y sobrevivir, además les da capacidad de adaptación a cambios ambientales futuros. (Hernández, 2008). Mientras mayor variabilidad genética posea una especie, mayor será su capacidad de adaptación a distintas condiciones. Por esto, una especie que exhibe poca diversidad genética es más vulnerable a la extinción (Bird y Molinelli, 2001).



Se han realizado numerosos estudios para evaluar la diversidad genética a nivel de ADN en árboles forestales. Muchos de ellos han usado una técnica muy popular para determinar variación genética a través de marcadores moleculares RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA o Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar). Gilles et al. (1997b), determinó la variación genética dentro y entre poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L. de Costa Rica usando la técnica RAPD. También se han efectuados estudios en *Cedrela odorata* L, con otros tipos de marcadores moleculares como los realizados por: Cavers et al. (2003a), con AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo para la Longitud de Fragmentos Amplificados) en poblaciones costarricenses, De la Torre et al. (2008), en poblaciones de la Amazona Peruana con AFLP y ADN de Cloroplasto, Cavers et al. (2003b), con ADN Cloroplasto en poblaciones de la región Mesoamericana, donde las poblaciones Nicaragüense analizadas (Ometepe, Masatepe, Wabule y La Trinidad), en este estudio fueron definidas como un solo haplotipo con las poblaciones de Honduras y el noroeste de Costa Rica.

Este estudio que proporciona información actualizada, basada en marcadores moleculares sobre la diversidad genética presente en estas poblaciones, es el primero de este tipo en Nicaragua y debe servir de base o guía para urgentes diseños de conservación y futuros programas de mejoramiento genético y reforestación en esta especie que constituye un invaluable recurso para nuestro país.



II

Objetivos



General:

- Determinar la variabilidad genética en cinco poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L.

Específicos:

- Estimar el grado de variación genética existente dentro y entre poblaciones de *Cedrela odorata* L.
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las cinco poblaciones estudiadas de *Cedrela odorata* L.



III

Marco Teórico



3.1. GENERALIDADES DE *Cedrela odorata* L.

Pertenece a una familia pantropical con 51 géneros y 550–600 especies, de las cuales 130 se encuentran en América tropical; 7 géneros y 22 especies en Nicaragua. La familia Meliaceae está ubicada en el orden Sapindales. La familia se divide naturalmente en dos grandes subfamilias: Melioideae y Swietenioideae, las cuales son claramente distinguidas por varios caracteres como las flores, frutos y la anatomía de la madera (Stevens, 2001).

Cedrela odorata L. conocido como cedro hembra, cedro español, cedro real, cedro rojo o cedro, es la especie más importante y ampliamente distribuida del género *Cedrela* (Patiño, 1997).

3.1.1. Taxonomía

Dominio: Eukaria
Reino: Plantae
Phyllum: Magnoliophyta
División: Streptophyta
Subdivisión: Spermatophytina
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Rosidae
Orden: Sapindales
Familia: Meliaceae
Subfamilia: Melioideae
Género: *Cedrela*
Especie: *Cedrela odorata* L.
(GBIF, 2007)



3.1.2. Descripción

Forma: Árbol caducifolio de 20–25 m de alto, fustes hasta 1.5–2 m de diámetro.

Corteza: La externa es de color gris-café a negra, con fisuras longitudinales irregulares y regularmente distribuidas, con las costillas escamosas. La interna es de color rosada cambiando a pardo amarillenta, fibrosa y amarga. Grosor total: 20 mm.

Hojas: Copa grande, redondeada, robusta y extendida o copa achatada. Hojas alternas, agrupadas en los extremos de las ramas, hasta 50 cm de largo, con 6–12 pares de folíolos; folíolos ovado-lanceolados a ovados, frecuentemente falcados, 7–15 cm de largo y 3–5 cm de ancho, ápice cortamente acuminado o agudo, base oblicuamente truncada, aguda o redondeada y asimétrica, generalmente glabros o con tricomas cortos en los nervios, en el envés con nervios secundarios prominentes; peciólulos presentes o ausentes.

Ovario: Globoso y glabro, lóculos con 10–14 óvulos, pistilodio angosto con óvulos rudimentarios. Cápsula péndula, oblongo-elipsoide a obovoide, 2–5 cm de largo y 1 cm de ancho, café o café-gris, con lenticelas blancas prominentes, valvas delgadamente leñosas, 0.5–1.5 mm de grueso.

Semillas: Aladas de 2–3.5 cm, café claras y entonces usualmente unidas a una columela leñosa o sin alas y entonces usualmente con un arilodio carnoso o una sarcotesta, raramente la sarcotesta leñosa o suberosa.

Inflorescencias: Terminales o subterminales, laxas, péndulas, muy ramificadas, 20–40 cm de largo, glabras o puberulentas; cáliz cupuliforme, irregularmente dentado con una hendidura lateral, glabro; pétalos 5, oblongos a elíptico-oblongos, 7–8 mm de largo y 1.5–2 mm de ancho, cortamente pubescentes en ambas superficies y a veces con densos tricomas adentro, blancos; estambres 2–3 mm de largo, anterodios delgados, cafés y arrugados (Stevens, 2001).

Flores: Perfectas o imperfectas y con los rudimentos del sexo opuesto bien desarrollados; cáliz leve o profundamente 4–5 lobado, prefloración abierta, contorta o



imbricada; pétalos 4–5, libres o a veces parcialmente connados, imbricados o valvados; filamentos parcial o completamente unidos formando un tubo estaminal, con o sin apéndices, o libres y entonces adnados a un androginóforo, anteras 5–12, pilosas o glabras, adheridas apicalmente en los filamentos o en el margen o en el interior de la garganta del tubo estaminal; disco nectarífero intraestaminal, anular, pateliforme, estipitado o ciatiforme o ausente.

Fruto: Una cápsula loculicida o septifragal o una drupa (Stevens, 2001).

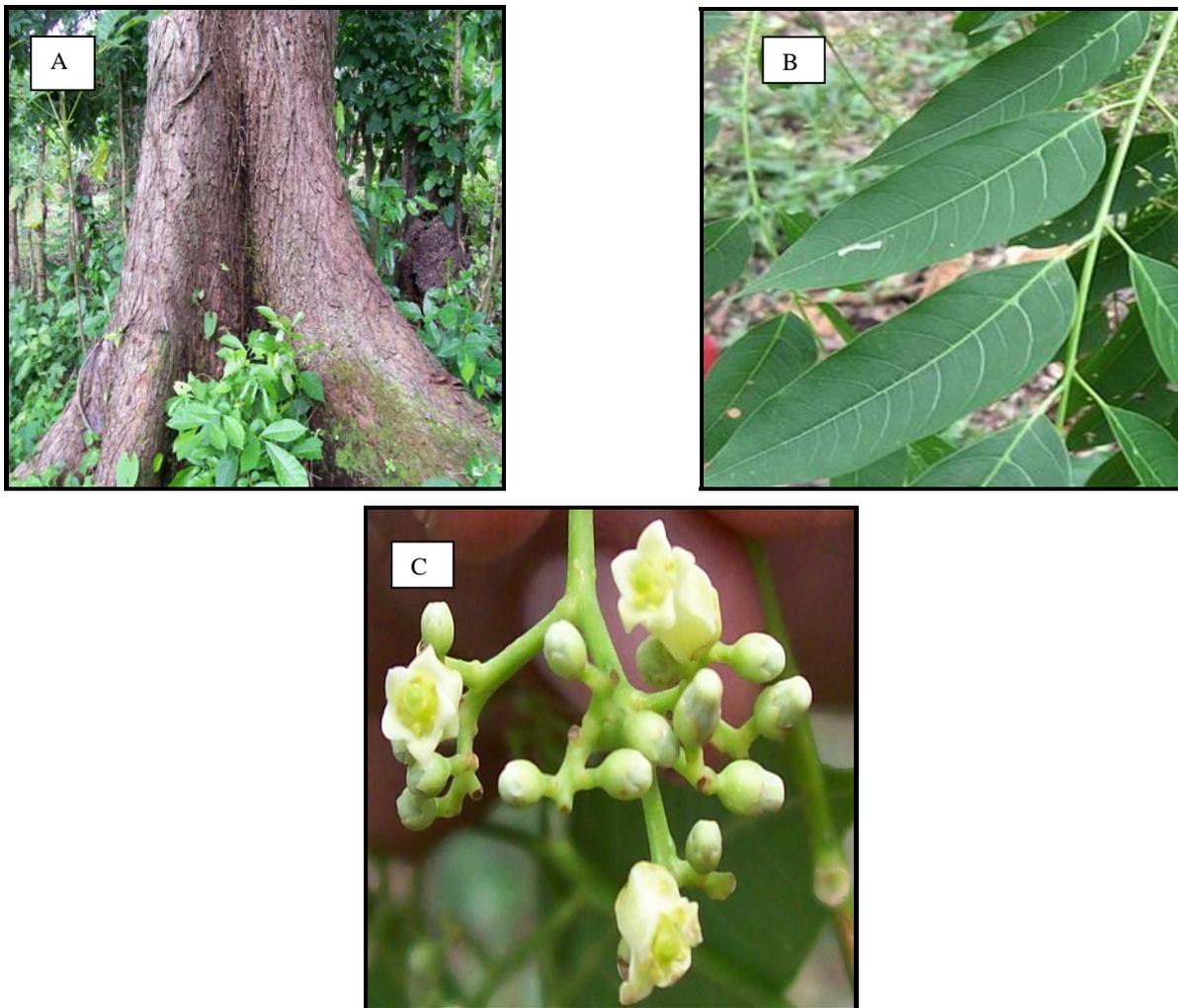


Figura 1. A: corteza de *Cedreia odorata* L., B: hojas, C: flores



Las ramitas, la corteza y los frutos verdes de la mayoría de los árboles tienen un fuerte olor a ajo cuando se rompen o aplastan, y el olor de las flores es desagradable (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, 2006).

3.1.3. Distribución y Ecología

Cedrela odorata L. se distribuye a lo largo de casi toda América tropical e islas del Caribe. Se la encuentra desde México (26° N en la costa del Pacífico) por el norte, hasta Argentina por el sur (28° S), también las Antillas. Ocupa altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 1200 m. Durante la evolución este grupo de plantas estuvo obligada a radificarse y adaptarse entre los trópicos. No se reporta en Chile ni en Paraguay (Stevens *et al.*, 2001).

Requiere de precipitaciones que oscilan entre 1200 y 3000 mm anuales por lo que su distribución es amplia y va de climas secos a muy húmedos, con respecto al suelo, se adapta a una gran variedad de suelos, principalmente bien drenados (Stevens *et al.*, 2001). Las gamas de temperaturas son una temperatura media máxima de 27-36° C durante el mes más cálido y una temperatura media mínima de 11-22° C en el mes más frío, con una temperatura media anual de 20-32° C (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, 2006).

3.1.4. Características Biológicas

Los árboles de *C. odorata* son moderadamente longevos se reporta un árbol en Belice con 110 anillos, y árboles con un contorno de 13-14" que tienen una edad media de 125 años. *C. odorata* es una especie monoica de rápido crecimiento, requiere luz, polinizada por insectos y sus semillas son dispersadas por el viento. El crecimiento temprano hasta 2,3 m/año es posible en condiciones favorables. Las flores aparecen



pronto en la estación lluviosa, y los frutos maduran durante la estación seca, cuando las hojas caducan. Las semillas son samaroides, de una cápsula dehiscente, y el viento las dispersa. Las flores presentan características asociadas con entomofilia; se cree que los principales polinizadores son las abejas y las mariposas (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, 2006).

3.1.5. Ciclo Reproductivo de *Cedrela odorata* L.

El ciclo reproductivo del cedro está sincronizado con la temporada de crecimiento del sitio; a través de su distribución florece al comienzo de la temporada lluviosa: de mayo a agosto en México, las Indias Occidentales y el norte de la América del Sur y de septiembre a octubre en Argentina. Las inflorescencias comienzan cuando las nuevas hojas empiezan a expandirse, las flores masculinas y femeninas aparecen en la misma inflorescencia, pero la especie es proterógina (las flores femeninas se abren primero). El desarrollo de las frutas toma aproximadamente de 9 a 10 meses y las frutas maduran durante la siguiente temporada seca. Los árboles comienzan a producir fruta a una edad de 10 a 12 años. La fruta, que consiste de una cápsula leñosa de buen tamaño, aparece cerca de la punta de las ramas. Las frutas maduran, se rajan y liberan las semillas cuando aún en el árbol materno (Cintrón, 1990).

3.1.6. La *Hypsipyla* principal amenaza para las Meliaceae

El barrenador de las Meliaceas, *Hypsipyla grandella* (Lep. Pyralidae) es una de las plagas forestales más severas conocidas en el trópico del continente Americano. El principal daño es causado por la larva que destruye el retoño terminal principal, barrenando en las puntas y haciendo túneles en los tallos jóvenes, el último instar larvario hila frecuentemente su capullo en el final superior del túnel, donde ellos pupan. El ciclo total de vida es completado en 4 a 7 semanas (promedio 5 semanas). Los



rebrotos de las plantas afectados por repetidos ataques del insecto, dan como resultado numerosas ramas laterales y, consecuentemente, árboles mal formados, indeseables para la producción de madera (Vergara, 1997).

Patiño (1997), cita que hay dos especies de *Hypsipyla* en los Neotrópicos: la *Hypsipyla grandella* Zeller y la *Hypsipyla ferrealis* Hampson, y una de importancia en el viejo mundo: la *Hypsipyla robusta*. Las dos especies principales que ocasionan daños a las especies de las Meliaceae son las *H. grandella* y la *H. robusta*. Hay pruebas de la evolución conjunta entre las especies de Meliaceae y las especies de *Hypsipyla*, ilustradas, por ejemplo por el carácter específico de la relación de las Meliaceae neotropicales con la *H. grandella* y de las Meliaceae asiáticas y africanas con la *H. robusta*. Hay muy pocos conocimientos sobre la genética de esta asociación. Se han realizado numerosas investigaciones con el fin de desarrollar métodos que contrarresten los efectos del insecto. Sin embargo, se han desarrollado pocas medidas prácticas y eficaces. Algunos autores han sugerido que una solución para luchar contra esta plaga podría ser mediante la búsqueda y selección de individuos resistentes.

3.1.7. Situación Actual de *Cedrela odorata* L.

Según Patiño (1997), los árboles tropicales se consideran particularmente vulnerables a los efectos de la degradación del hábitat debido a su demografía y características de reproducción, incluyendo la baja densidad de ocurrencia, sistemas complejos de reproducción autoincompatibles, las altas tasas de entrecruzamiento e íntimas interacciones con los polinizadores y dispersores de semillas.

La diversidad genética en los bosques tropicales se está perdiendo rápidamente debido al proceso de deforestación, que ha reducido el tamaño de las comunidades naturales de árboles existentes, ha eliminado poblaciones locales, o las ha fragmentado



al grado de propiciar un aislamiento de las poblaciones continuas, lo que puede conducir a una pérdida de la diversidad genética si éstas no son del tamaño adecuado. Lo anterior pone de manifiesto el riesgo en el que se encuentran los bosques tropicales y sus recursos genéticos, especialmente de las especies de interés económico como las Meliaceas.

La Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (2006), reportó que si bien la mayor amenaza para los bosques naturales en la región de América Central es la conversión de la tierra en otros usos, la explotación selectiva de madera constituye una particular amenaza para las especies nativas, entre ellas *Cedrela odorata* y *Swietenia macrophylla*.

La larga historia de explotación excesiva de *Cedrela odorata* L. por su valiosa madera, junto con la amplia pérdida de hábitat debido a la deforestación es una gran amenaza para el futuro de la especie. La madera es valiosa por su resistencia a la podredumbre, a los insectos y como madera de calidad. En consecuencia, se ha talado selectivamente desde más de dos siglos, tanto para uso nacional como para la exportación. La tala ha continuado hasta tal extremo que numerosos países en su área de distribución nativa informan de que se ha reducido su número, en algunos casos hasta el punto de estar amenazada. En muchos lugares, las poblaciones se han limitado a zonas inaccesibles. Los árboles grandes y bien formados son ahora particularmente poco comunes.

La especie no tolera la sombra y la regeneración natural es escasa después de la tala. La explotación de *Cedrela odorata* L. de bosques naturales no es sostenible, en particular porque el posible hábitat de que se dispone para la especie se ha reducido considerablemente a causa de la deforestación. La tala selectiva en bosques naturales destruye los árboles con la mejor forma de crecimiento (selección disgénica), dejando así una población agotada en los genotipos más favorecidos.



Situación similar se presenta en Nicaragua. Durante el muestreo realizado en este estudio, se pudo observar que han quedado poblaciones remanentes de *Cedrela odorata* L. en sitios como Esquipulas, Matagalpa, y La Trinidad en Estelí, donde se encuentran árboles aislados a orilla de la carretera a diferencia de las poblaciones de Bella Vista en el Casita, Chinandega que se encuentran bien conservadas debido a lo inaccesible del lugar. Con respecto *Hypsipylla grandella* en estas poblaciones muestreadas no se encontró problema de ataques, esto sería debido a que los individuos de estas poblaciones están en estado adulto. Lindo (2007), quien realizó un estudio por la UNAN-León, para obtener la Validación del Método Uso de Algodón en plantaciones de *Cedrela* y *Swietenia*, cita que el ataque es menos frecuente en el bosque natural en donde los arboles hospederos son pocos o muy esparcidos de manera que nunca se desarrolla una alta acumulación de insectos y menos frecuente en la sombra que bajo el sol.

Según datos del INAFOR, de las 33 especies más usadas en la industria, el volumen promedio por hectárea del uso comercial de *Cedrela odorata* L. en Nicaragua es 0.28 m³. (García, 2003). Paniagua (s.f.), reporta la situación de *Cedrela odorata* L. en el Municipio El Castillo, Río San Juan, donde se encuentra en promedio un árbol cada 100 hectáreas, con volumen promedio de 3m³/árbol, debido a la sobreexplotación de esta especie, por lo que entra a la categoría de especies en peligro de extinción.

Aunque *C. odorata* se considera entre las especies latifoliadas tropicales más importante en los neotrópicos, se le ha dado poca atención al conocimiento de la extensión de su variación genética existente dentro de su rango de distribución natural y entre sus poblaciones. El mantenimiento de la variación genética es esencial para asegurar en el futuro el suministro de su madera. Esto justifica la necesidad de conocer a fondo la diversidad genética, en sus diferentes niveles, para aprovecharla en las tareas de manejo, mejoramiento, fomento y conservación (Patiño, 1997).



3.1.8. Diversidad Genética de las Plantas

Patiño (1997), cita que la estructura genética de una especie está definida por la forma y la magnitud en la cual la variación genética se distribuye entre y dentro de sus poblaciones, como resultado de una serie de procesos en el tiempo y en el espacio, como la mutación, migración, selección, aislamiento geográfico y flujo genético entre poblaciones, todo ello fuertemente influenciado por los sistemas de cruzamiento de las especies y por la dispersión de polen y semillas.

El entendimiento de la estructura genética de una especie es esencial para lograr su apropiada caracterización, ya sea para el manejo y uso sostenible de las poblaciones naturales, el establecimiento de plantaciones, el mejoramiento genético de esos recursos, o bien, para la conservación de los mismos; desafortunadamente esta información es muy limitada o no existe para la mayoría de las especies tropicales.

La distribución de la variación genética está influenciada por varios factores, que son: tamaño efectivo de cruzamiento, la forma de dispersión de semillas y el tipo de comunidad donde la especie es frecuente. También Patiño (1997), reporta 1978 Roche indicó que la estructura genética de las especies vegetales y de sus poblaciones está determinada en parte por las características del nicho ecológico en el cual se desarrollan, definiéndolo como el conjunto de condiciones del ambiente que permite la sobrevivencia de una población en estrecho contacto con ese ambiente.

3.2. BASES GENÉTICAS DE LA EVOLUCIÓN

3.2.1. Genética de Poblaciones

Una **población** puede ser definida como un grupo de organismos de la misma especie que se cruzan entre sí y que comparten una localización en el espacio y en el



tiempo (Curtis y Barnes, 2000). El sustrato básico donde se forja la evolución son las poblaciones y no los individuos. El reconocimiento de que la evolución es un fenómeno que se da en las poblaciones fue uno de los discernimientos fundamentales de Darwin (Audesirk *et al.*, 2003).

Si bien Darwin reconoció que en las poblaciones ocurre evolución, no supo como se transfieren los rasgos a las generaciones sucesivas (Solomon *et al.*, 1996). El concepto de gen propuesto por Mendel, pero desconocido por Darwin, permitió comprender de qué manera las variaciones podían originarse, preservarse y transmitirse de una generación a la siguiente, un hecho que Darwin no estuvo en condiciones de explicar (Curtis y Barnes, 2000).

De la síntesis entre la evolución Darwiniana y los principios Mendelianos surgió una rama de la biología que se conoce como **genética de población** (Curtis y Barnes, 2000) la cual estudia la frecuencia, distribución y herencia de los alelos en las poblaciones (Audesirk *et al.*, 2003).

Así mismo, una población es una unidad definida por un **acervo génico o poza génica** que simplemente es la **suma de todos los genes de una población**, es decir, el acervo génico se compone de todas los alelos de todos los genes de cada uno de los individuos de esa población. También se puede considerar que cada gen en particular tiene su propia poza génica, que se compone de todos los alelos de ese gen específico en una población. Si se suman los alelos de ese gen en la totalidad de los individuos de una población, se puede determinar las proporciones relativas de los diferentes alelos, lo que se conoce como **frecuencia de alelos** (Audesirk *et al.*, 2003).

El acervo genético de las poblaciones contiene grandes reservas de variaciones genéticas que se han introducido por mutación. La reproducción sexual a través de la



meiosis, y la unión de gametos, permiten a la variabilidad introducida por la mutación combinarse de nuevas formas, que pueden expresarse como nuevos fenotipos (Solomon *et al.*, 1996).

3.2.2. Equilibrio de Hardy-Weinberg

Según Curtis y Barnes (2000), a partir del siglo XX, los genetistas comenzaban a comprender las leyes de la herencia y el origen de nueva variabilidad a partir de la mutación. Sin embargo, dado que la evolución es un proceso que se desarrolla a través del tiempo, era necesario indagar cómo se comportaba la variabilidad presente en una población a través de generaciones.

En 1908, fue propuesta por Godfrey Harold Hardy, un matemático inglés y Wilhelm Weinberg, un médico alemán, un modelo teórico para demostrar que las combinaciones que resultan del proceso de apareamiento y reproducción que ocurren en cada generación en los organismos diploides no involucran un cambio en la composición general del reservorio génico.

Se le da el nombre a esta población idealizada sin evolución de **población en equilibrio**, en donde, las frecuencias de alelos y las frecuencias de genotipos de una población permanecen constantes, independientemente del número de generaciones que transcurran. Según Audesirk *et al.* (2003) para que ocurra esto se deben cumplir varias condiciones:

1. No debe haber mutaciones.
2. No debe haber flujo de genes entre poblaciones; es decir, no debe haber migración neta de alelos hacia la población (por migración) o desde ella (por emigración).



3. La población debe ser muy grande.
4. Todo apareamiento debe ser aleatorio, sin que exista tendencia de ciertos genotipos a aparearse con otros genotipos específicos.
5. No debe haber selección natural, es decir, todos los genotipos deben ser igualmente adaptables y alcanzar el mismo éxito reproductivo.

La evolución consiste en cambios en la constitución de los acervos génicos; es decir, en cambios en las frecuencias génicas así como en cambios asociados existentes entre los alelos de distintos loci génicos (Dobzhansky *et al.*, 1993). La teoría de la genética poblacional predice que el equilibrio de Hardy-Weinberg puede ser alterado por desviaciones respecto a cualquiera de las cinco condiciones principales en las que se basa (Audesirk *et al.*, 2003).

Los principales agentes que pueden cambiar las frecuencias de los alelos en una población son: mutación, flujo de genes, deriva genética, apareamiento no aleatorio y selección natural (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.3. Mutación

Las mutaciones ocurren al azar y en forma espontánea. Las frecuencias de mutación son relativamente estables para un locus específico, pero varían en varios órdenes de magnitud entre loci de una especie dada y una especie diferente (Solomon *et al.*, 1996). Desde el punto de vista de la genética de las poblaciones, las mutaciones son cambios heredables del genotipo (Curtis y Barnes, 2000). Las células cuentan con mecanismos eficientes que protegen la integridad de sus genes, incluso las enzimas que constantemente examinan el ADN y reparan los defectos provocados por la radiación, los cambios químicos o los errores de copiado, algunos cambios en la secuencias de nucleótidos escapan, pese a todos los sistemas de revisión y reparación.



Cuando uno de estos cambios ocurren en una célula productora de gametos, es posible que la mutación se transmita a un descendiente y se introduzca en la poza génica de la población aportando variación. Las mutaciones por sí mismas no es una de las fuerzas principales de la evolución. Sin embargo, las mutaciones son las fuentes de nuevos alelos, es decir, de nuevas variantes susceptibles de heredarse que sirven de base para otros procesos evolutivos, como la migración, en especial la selección natural que inciden en ese potencial, pueden favorecer la diseminación de una mutación entre la población, o bien eliminarla (Audesirk *et al.*, 2003).

Dobzhansky *et al.* (1993), las mutaciones pueden ocurrir puntualmente en un gen, y en este caso, se denominan **mutaciones génicas o puntiforme**, éstas se producen cuando se altera la secuencia de ADN de un gen y la nueva secuencia de nucleótidos es transmitida a la descendencia. El cambio puede ser debido a la sustitución de uno o de unos pocos nucleótidos por otros, o bien a la adición o pérdida de uno o varios nucleótidos. Las sustituciones de nucleótidos pueden ser, o bien **transiciones o transversiones**. Las **transiciones** son sustituciones de una purina por otra purina (A por G o viceversa) y de una pirimidina por otra pirimidina (C por T o viceversa). Las **transversiones** son sustituciones de una purina por una pirimidina o viceversa (C o T ya sea por A o G y viceversa).

Las mutaciones también pueden afectar al número de cromosomas o bien al número o la disposición de los genes de un cromosoma y se denominan mutaciones **cromosómicas o aberraciones**. Según Dobzhansky *et al.* (1993), las mutaciones cromosómicas pueden clasificarse de la siguiente forma:

1. Cambios en el número de genes presentes en el cromosoma.

- A. **Deficiencia o delección**. En un cromosoma se pierde un segmento de ADN que contiene uno o varios genes.



- B. **Duplicación.** En un conjunto de cromosoma se presenta más de una vez un segmento de ADN que contiene uno o varios genes. Las duplicaciones se producen con frecuencias en tándem, es decir, los segmentos duplicados se disponen uno a continuación del otro en el mismo cromosoma.
2. Cambios en la situación de los genes en los cromosomas.
- A. **Inversión.** En un cromosoma se invierte la situación de un bloque de genes. Cuando el segmento invertido incluye el centrómero, la inversión se denomina **pericéntrica**; en los demás casos se denominan **paracéntrico**.
- B. **Translocación.** Se cambia la situación de un bloque de genes de un cromosoma a otro. Las translocaciones más frecuentes son las recíprocas, que suponen un intercambio de bloques de genes entre cromosomas no homólogos. Un segmento cromosómico también puede desplazarse a una posición nueva en otro cromosoma sin que el intercambio sea recíproco o también dentro del mismo cromosoma; estos cambios se denomina a veces transposiciones.
3. Cambios en el número de cromosomas. Según este mismo autor, estos cambios son de cuatro tipos; los dos primeros no afectan a la cantidad total de material hereditario, los dos restantes sí.
- A. **Fusión.** Dos cromosomas no homólogos se fusionan en uno. Esto implica la pérdida de un centrómero.
- B. **Fisión.** un cromosoma se fragmenta en dos. Se ha de producir un centrómero adicional, ya que en caso contrario el cromosoma nuevo se perdería cuando la célula se divide.
- C. **Haploidía y poliploidía.** El número de dotaciones de cromosomas no es igual a dos. La mayoría de organismos son diploides, es decir, en sus células



somáticas presentan dos dotaciones de cromosomas, pero en las células gaméticas sólo una. Algunos organismos son, sin embargo, normalmente haploides, es decir, sólo presentan una dotación cromosómica.

3.2.4. Flujo de Genes

Cuando los individuos pasan de una población a otra y se cruzan en la nueva localidad, se transfieren alelos de un acervo génico a otro (Audesirk *et al.*, 2003). Debido a esto, el flujo de genes puede incrementar la cantidad de variabilidad genética dentro de las poblaciones que las reciben. Sin embargo, si este flujo es bastante grande tiende a reducir las diferencias genéticas entre poblaciones o seas estas poblaciones se vuelven genéticamente similares (Salomon *et al.*, 1996).

El flujo de genes puede introducir alelos nuevos en una población o puede cambiar la frecuencia de los alelos independientemente de su valor adaptativo.

3.2.5. Deriva Genética

A como lo sugiere Solomon *et al.* (1996), la producción de cambios evolutivos al azar en poblaciones reproductivas pequeñas se denomina **deriva genética**, la cual da por resultado cambios en el acervo génico, porque afecta y modifica las frecuencias alélicas por acontecimientos al azar.

El tamaño de una población tiene efectos importantes en las frecuencias alélicas, ya que la probabilidad de una desviación respecto a una frecuencia inicial se relacione en forma inversa con el tamaño de la población, es decir cuanto menor es la población mayor es la deriva genética, con el resultado de la pérdida de algunos alelos y de la reducción de la diversidad genética. Aunque la deriva genética puede reducir la



variabilidad genética dentro de una población, tiende a incrementar la cantidad de variación entre poblaciones locales.

Dos casos especiales que demuestran las enormes consecuencias de un tamaño de población reducido en las frecuencias de alelos de una especie, son conocidos como: cuello de botella y efecto fundador (Audesirk *et al.*, 2003).

3.2.5.1. Cuello de Botella

Es el tipo de deriva genética que resulta por la reducción de manera drástica del tamaño de la población. Por ejemplo, a consecuencias de una catástrofe natural o por caza excesiva, pueden aniquilar grandes cantidades de individuos de una manera no selectiva, produciendo una pequeña población sobreviviente donde hay pocos individuos disponibles para aportar genes a la población futura (Audesirk *et al.*, 2003). En estos casos se dice que la población pasa por un cuello de botella en el cual puede ocurrir deriva genética entre los pocos sobrevivientes. Cuando la población vuelve a aumentar de tamaño, las frecuencias de muchos alelos son muy distintas de la que habían en la población previa, por lo que no tendrá la misma conformación genética que en la población original (Salomon *et al.*, 1996).

Los cuellos de botella en las poblaciones provocan al mismo tiempo cambios en las frecuencias de alelos y reducción de la variabilidad genética (Audesirk *et al.*, 2003).

3.2.5.2. Efecto Fundador

Cuando uno o pocos individuos traspasan los límites del territorio habitual de su especie y establecen una nueva colonia, los colonizadores llevan consigo una pequeña muestra al azar de los alelos del acervo genético del cual provienen, y al principio su



población es lo suficientemente pequeña para que opere la deriva genética, este fenómeno, que es un caso de deriva genética, se conoce como **efecto fundador**. Como resultado, las poblaciones aisladas pueden tener frecuencias alélicas muy distintas de las que caracterizan a la especie de donde proceden, y estas diferencias bien pueden ser aleatorias más que adaptativas (Solomon *et al.*, 1996).

Es posible que estas poblaciones pequeñas o aisladas, contribuyan de forma importante al cambio evolutivo. Las poblaciones de este tipo son probablemente una de las fuentes principales de especies nuevas (Audesirk *et al.*, 2003).

3.2.6. Apareamiento No Aleatorio

El equilibrio de Hardy-Weinberg también puede alterarse cuando los individuos de una población no se aparean aleatoriamente. Toda forma de apareamiento no aleatorio altera la frecuencia de alelos en la población que se lleva a cabo. Una forma de apareamiento no aleatorio particularmente importante en las plantas es la autopolinización (Curtis y Barnes, 2000).

3.2.7. Selección Natural

El principal factor de cambio en la composición del acervo génico es la selección natural. La deriva genética es el cambio al azar que puede cambiar la frecuencia de los alelos, incluso dar origen a especies nuevas. La mutación que aporta una variabilidad inicial de las características hereditarias y el flujo génico pueden ocurrir en un sentido dado, pero este sentido no se relaciona con la naturaleza del ambiente. Sólo la selección natural conduce al cambio evolutivo adaptativo (Salomon *et al.*, 1996). Por otra parte, la selección natural modifican las frecuencias dentro de las poblaciones o



incrementan las diferencias de frecuencias entre poblaciones, produciendo poblaciones más adaptadas a condiciones locales más diferentes (Curtis y Barnes, 2000).

Cada ambiente tiene sólo una cantidad limitada de recursos, y la supervivencia en un ambiente limitado depende, en parte, de las características de los organismos heredadas de los padres. Por lo que dentro de una población con variaciones, los individuos que heredan las características que los adaptan mejor a su ambiente tienen mayor posibilidad de sobrevivir y de reproducirse; estos individuos tienden entonces a dejar más descendencia que los individuos menos adaptados. La selección natural es el éxito de la reproducción diferencial o desigual, siendo por lo tanto, el mecanismo básico de la evolución (Campbell *et al.*, 2001).

3.3. PRESERVACIÓN Y PROMOCIÓN DE LA VARIABILIDAD

Entre los factores que promueven el incremento de la variabilidad genéticas de las poblaciones de acuerdo a los siguientes autores (Alberts *et al.*, 1996), (Curtis y Barnes, 2000), (Puertas, 1999) y (Solomon *et al.*, 1996) están los siguientes:

3.3.1. Reproducción Sexual

La reproducción sexual confiere una ventaja competitiva a los organismos. Parece ser que la redistribución de los genes a través de la reproducción sexual ayuda a la especie a sobrevivir en un ambiente que sufre alteraciones imprevisibles. Si un progenitor produce numerosos descendientes, con una gran variedad de combinaciones génicas, existen más probabilidades de que como mínimo uno de sus descendientes tenga el conjunto de características necesarias para sobrevivir. La evolución depende en gran manera de la competencia entre individuos que son portadores de alelos, o variantes alternativos producidos por mutación de determinados



genes. La reproducción sexual promueve la variabilidad genéticas en cantidades extraordinarias al producir nuevas combinaciones de tres modos:

1. Por crossing-over (entrecruzamiento) con recombinación genética en la meiosis.
2. Por distribución independiente de los cromosomas (segregación cromosómica) en la meiosis.
3. Por la recombinación de los dos genomas parentales en la fecundación.

3.3.2. Mecanismos que Promueven la Exogamia

La exogamia se promueve cuando los individuos que producen los núcleos gaméticos no están emparentados, al contrario si están emparentados lo que se produce es la **endogamia**.

En las poblaciones que se reproducen sexualmente, se ha desarrollado muchas maneras que promueven nuevas combinaciones genéticas. Entre las plantas, una variedad de mecanismos como la presencia de alelos de autoesterilidad, adaptaciones anatómicas que inhiben la autofecundación en las plantas y diversas estrategias de comportamiento que inhiben el cruce; aseguran que el polen que lleva los núcleos espermáticos provenga de un individuo diferente al del estigma sobre el cual se deposita.

En consecuencia, el sistema de autoesterilidad estimula fuertemente la variabilidad de las poblaciones; la selección a favor del alelo raro lo hace más común, mientras que los alelos más comunes se vuelven más raros.



3.3.3. Diploidía

Otro factor que contribuye a preservar la variabilidad en los eucariotas es la **diploidía**. Ésta es ventajosa sobre la **haploidía** dado que, como los seres diploides disponen de dos genes para cada uno de los caracteres, si uno de ellos no funciona correctamente, el otro lo puede compensar.

En un organismo haploide, las variaciones genéticas se expresan inmediatamente en el fenotipo y por ello quedan expuestas al proceso de selección. Sin embargo en un organismo diploide, estas variaciones pueden almacenarse como alelos recesivos. La diploidía, protege a los alelos recesivos raros de la selección natural.

3.3.4. Superioridad de los Heterocigotos

Algunas veces un individuo que es heterocigoto en un locus específico, expresa un fenotipo más extremo que cualquiera de los progenitores homocigóticos que a veces pueden ser favorecidos por la selección, manteniendo así ambos alelos en la población. Los genetistas llaman a este fenómeno, en el que los heterocigotos tienen un éxito reproductivo mayor que cualquiera de los homocigotos, **superioridad de heterocigoto**.

La superioridad del heterocigoto puede dar como resultado un fenómeno conocido como **heterosis o vigor híbrido**, en donde los híbridos, por definición, son heterocigóticos en muchos más loci que la mayoría de las variedades naturales. La superioridad de los híbridos puede deberse tanto al enmascaramiento en heterocigotos de los posibles efectos perjudiciales de alelos recesivos, como a las ventajas positivas conferidas por la mayor heterocigosis.



Se cree que la heterosis es uno de los mecanismos genéticos más difundidos mediante los cuales se mantienen los polimorfismos en las poblaciones. Sin embargo, el apareamiento entre individuos de especies cercanas (hibridación) puede originar también un descenso en la fertilidad o la producción de descendientes menos viables, debido a la **depresión exogámica**.

3.4. MARCADORES GENÉTICOS

El **polimorfismo genético** es la presencia en una población de dos o más alelos para un gen dado. Los acervos génicos contienen una enorme reserva de polimorfismo genético, mucho de él presente en baja frecuencia y también en gran parte oculto, pueden ser detectados utilizando marcadores genéticos.

Una diferencia, bien sea fenotípica o genotípica, puede actuar como marcador genético, si identifica en un individuo características del genotipo, del fenotipo, o de ambos, y si además, puede hacerse seguimiento a su herencia a través de varias generaciones (IPGRI y Cornell University, 2003).

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. Hay dos tipos principales de marcadores: los **morfológicos** y los **moleculares** (Solís y Andrade, 2005).



3.4.1. Marcadores Morfológicos

Estos marcadores fueron el primer tipo que el hombre utilizó para estimar la variación que existe dentro y entre las poblaciones, mediante la evaluación de sus diferencias morfológicas (IPGRI y Cornell University, 2003). Se consideran marcadores morfológicos a los caracteres de un individuo que se expresan en un ambiente específico y que el hombre identifica con un objetivo determinado (Solís y Andrade, 2005). Tienen la ventaja de que son fácilmente realizables, no requieren de un equipo sofisticado y son la apreciación más directa de un fenotipo; por consiguiente, están al alcance para uso inmediato, lo que es un atributo importante. Sin embargo, las determinaciones morfológicas deben ser tomadas por un experto en la especie, están sujetas a cambios debidos a factores ambientales, pueden variar en las diferentes etapas del desarrollo de las plantas, y su número es limitado (IPGRI y Cornell University, 2003).

3.4.2. Marcadores Moleculares

Según Claro (s.f.), además de los marcadores morfológicos, en las últimas décadas se utilizan otros tipos de marcadores genéticos denominados **marcadores moleculares**, los cuales son biomoléculas de proteína (antígenos e isoenzimas) o de ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida) que se pueden relacionar con un rasgo genético. Un marcador molecular **monomórfico** es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es **polimórfico**. A veces el grado de variación es tal que se denominan **hipervariable**.

En la década de los 70 se desarrollaron los primeros marcadores moleculares basados en la identificación de proteínas como las isoenzimas mediante la



electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida, los cuales son conocidos también como marcadores bioquímicos. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico. Pero esta técnica tenía una limitación muy importante: no era capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra, de un medio ambiente a otro, y de una época del año a otra.

Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los **marcadores moleculares basados en el ADN**, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades.

El número de técnicas descritas es cada vez más numeroso, y muchas de ellas están basadas en la amplificación del ADN mediante la reacción de **PCR (Polymerase Chain Reaction o Reacción en Cadena de la Polimerasa de ADN)** (Picca *et al.*, 2004).

Satz y Kornblihtt (1993) señalan que en 1983, Kary Mullis, un investigador de la Corporación Cetus, inventó el método de PCR para lograr la síntesis de grandes cantidades de un fragmento de ADN sin necesidad de recurrir a los vectores y su replicación en bacterias. Este método revolucionó en corto tiempo el conjunto de técnicas de la biología molecular. Su uso se extendió rápidamente a miles de laboratorios, no sólo de investigación básica, sino también de diagnóstico clínico.

Rodríguez y Barrera (2004), citan que la PCR es un método *in vitro* de síntesis de ADN con el que un segmento particular de éste, es específicamente amplificado al ser delimitado por un par de cebadores o iniciadores que lo flanquean. Su copiado se



logra en forma exponencial a través de repetidos ciclos de diferentes periodos y temperaturas de incubación, en presencia de una enzima ADN polimerasa termoestable). De esta manera, esta técnica permite multiplicar ("amplificar" es, en realidad, el término que se ha impuesto) pequeñas cantidades de ADN entre cientos de miles y millones de veces. El tramo destinado a reproducirse puede tener desde cincuenta hasta más de dos mil nucleótidos de longitud. El segmento de ADN que sirve de molde no requiere estar necesariamente en estado puro, sino que puede ser parte de mezclas complejas, puede ser, por ejemplo, ADN nuclear.

Para realizar una PCR se necesita mezclar en un tubo el ADN que contiene la secuencia a amplificar, ambos cebadores o primers que se alinearán a las cadenas simples del ADN, la mezcla de los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfatos (dNTPs) en cantidades suficientes, el tampón de reacción para la polimerasa, agua para completar el volumen final de reacción (que normalmente oscila entre 20 y 100 μ l), y como ingrediente final crucial para la reacción, la enzima ADN polimerasa termoestable

Esta mezcla se somete a ciclos de tres reacciones sucesivas llevadas a cabo a distintas temperaturas. Estas reacciones se repiten cíclicamente entre veinte y cuarenta. La mezcla se calienta, en el primer paso, hasta lograr la ruptura de los puentes de hidrógeno que permite separar las dos cadenas que constituyen el ADN, hecho que se conoce como "desnaturalización" (Satz y Kornblihtt, 1993). Este paso expone las bases nitrogenadas del ADN blanco. En el segundo paso, la temperatura se reduce para que ocurra la hibridación de las cadenas desnaturalizadas del ADN blanco con los cebadores (ADN sintético de hebra sencilla), mediante el apareamiento de las bases nitrogenadas complementarias de ambas clases de ADN. Esta temperatura depende de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores que generalmente oscila entre 50 y 60°C. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno



de estos cebadores debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde (Rodríguez y Barrera, 2004).

En tercer paso, a una temperatura de 72°C, una enzima ADN polimerasa extiende los cebadores en el espacio comprendido entre ambos, sintetizando las secuencias complementarias de las hebras del ADN molde. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza está condicionada por aquélla a la cual "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los cebadores (Satz y Kornblihtt, 1993).

La necesidad de disponer de información previa acerca de la secuencia del ADN a amplificar para diseñar oligonucleótidos, limitó inicialmente el desarrollo de marcadores basados en la reacción de PCR en plantas. La primera solución a este problema vino de la mano de los **RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs o Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados Aleatoriamente)** (Picca *et al.*, 2004).

3.4.3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

En 1990, Williams y colaboradores presentaron un método basado en la técnica de PCR, en la que se utiliza cebadores arbitrarios para obtener marcadores moleculares en cualquier tipo de genoma, denominaron a éste método como "Random Amplified Polymorphic DNA" (RAPD) y a los polimorfismos que se producen "marcadores



RAPDs". En esta técnica a diferencia de la PCR no se necesita conocer la secuencia del ADN a amplificar y utiliza solo un cebador de 9 ó 10 nucleótidos de longitud, con una composición en G+C entre 50% y 80%. Cada cebador amplifica por PCR varios segmentos de ADN y en muchos de ellos aparecen polimorfismos entre las especies analizadas, tanto de organismos procariotas como de eucariotas (Enrech, 2000).

El método RAPD fue adoptado de inmediato por su simplicidad y bajo costo, no requerir de marcadores radioactivos y utilizar cantidades mínimas de ADN. El polimorfismo detectado puede deberse a un simple cambio de un par de bases, inserciones o deleciones que modifican o eliminan el sitio de inserción del cebador; o también inserciones en la secuencia genómica que separan los sitios de inserción del cebador a una distancia que no permite la amplificación (Enrech, 2000). Para que la amplificación sea exitosa, la hibridación de las dos copias del cebador no deben exceder 5000 pb para lograr la amplificación del segmento (Spooner *et al.*, 2005). Las bandas generadas se pueden clasificar de acuerdo a su intensidad de tinción (fuerte, mediana, débil) frente al bromuro de etidio, lo cual puede ser un reflejo de la especificidad de la amplificación (Enrech, 2000).

En cuanto a la estandarización del protocolo de amplificación deben establecerse las concentraciones óptimas, de acuerdo al material a utilizarse, de Mg_2^+ , de la enzima Taq ADN Polimerasa, del cebador y del ADN. Una vez estandarizadas las condiciones, éstas deben mantenerse invariables durante todas las reacciones PCR en las cuales se utilice el material biológico para el cual fueron establecidas (Enrech, 2000).

A pesar del menor costo y menor número de etapas y tiempo para la obtención de resultados en comparación con otras técnicas moleculares, el marcador RAPDs tiene algunas desventajas como la característica dominante: no es posible distinguir cuando un segmento de ADN ha sido amplificado a partir de un locus heterocigoto (1



copia) u homocigoto (2 copias) (Enrech, 2000). Y además, la dificultad de asumir homología entre dos segmentos amplificados de igual tamaño y sensibilidad a pequeñas modificaciones en la concentración de los componentes de la reacción, pudiendo producir alteraciones en el patrón de los marcadores (Povh *et al.*, 2008).

3.4.4. Diversidad Genética en Meliaceae Detectada por Marcadores RAPDs

Se han realizando algunos estudios genéticos en poblaciones naturales, con el objetivo de caracterizar la diversidad genética para las especies de Meliaceae.

Chalmers *et al.* (1994) describieron la aplicación de la técnica RAPD para determinar la magnitud de la variación genética entre ocho especies de cuatro géneros de Meliaceae, donde observaron diferencias genéticas profundas entre especies y géneros. Definieron una clara separación de *C. odorata* de las otras especies, encontrando que 95 % de las variables de la ampliación de productos, diferían en relación a otros géneros, mientras que *Lovoa trichilioides*, *Khaya* spp. y *Swietenia* spp. se agruparon en forma más próxima entre sí. Estos resultados son consistentes con el punto de vista taxonómico actual. Se encontró que algunos marcadores genéticos pueden ser útiles para el diagnóstico de algunas especies en particular y de gran valor para la determinación del estatus de algunos híbridos putativos. Los autores discuten la importancia de la aplicación de la técnica RAPD para el estudio de la variación genética en Meliáceas, sobre todo en el contexto de su utilidad para planear estrategias para la conservación genética de esta familia.

Gillies *et al.* (1995a), desarrollaron marcadores para cuantificar el nivel de variación genética dentro y entre las poblaciones de *C. odorata*; empleó la técnica RAPD para evaluar la diversidad y el efecto de la corta selectiva sobre la base genética de esas poblaciones naturales. Las poblaciones colectadas de la costa Pacífica de



Costa Rica expresan perfiles que son bastante distintos de aquellos individuos colectadas en la costa Caribeña, y los individuos del Caribe de Costa Rica difieren de los individuos de otros países de Centro y Sudamérica incluidos en el análisis.

Una explicación aparente podría ser la presión por selección en las áreas muy húmedas de adaptarse a un medio con una alta humedad durante todo el año y a la competencia con vegetación de bosque muy húmedo y pluvial que posee una alta agresividad y crecimientos en altura y diámetro considerablemente mayores a otras áreas más secas.

El estudio detectó diferentes niveles de diversidad dentro de las poblaciones, por ejemplo un cebador dio un índice de 0.91 para una población, mientras que otro dio un índice de 2.51 para la misma población. Se utilizó el índice de diversidad de Shannon para medir la diversidad dentro y entre las poblaciones; los resultados variaron de acuerdo al "primer" o cebador utilizado, sin embargo, todos los cebadores indican que hay más variación entre las poblaciones que dentro de ellas, siendo ésta en promedio del 60.4 % y 39.6 % para la diversidad dentro de las poblaciones.

Otro estudio realizado por Gilles et al. (1997b), determinó la variación genética dentro y entre diez poblaciones naturales de *Cedreia odorata* L. de Costa Rica usando la técnica RAPD. Los resultados de este estudio indicaron diferencias genéticas significativas entre las poblaciones pertenecientes a la zona del Pacífico Norte, con respecto a las del Atlántico/Pacífico Sur fue de 35.3 % y el 65.1 % del total de la variación fue atribuible a las diferencias dentro de las poblaciones. Los valores de diversidad dentro de las poblaciones calculados por el Índice de diversidad de Shannon variaban enormemente entre primers, pero en general, los componentes de la diversidad genética dentro de las poblaciones fueron de 0.45.



IV

Materiales y

Métodos



4.1. OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Para desarrollar el presente estudio se analizaron 92 individuos de *Cedrela odorata* L. pertenecientes a 5 poblaciones naturales de Nicaragua: Bella Vista en el Volcán Casita, Chinandega; Esquipulas en Matagalpa; Masatepe en Masaya; El Refugio en el Volcán Mombacho, Granada; y La Trinidad en Estelí. Véase la Tabla 1 para detalle de la ubicación geográfica de los departamentos donde se recolectaron las muestras.

Aunque existen otras poblaciones naturales de *Cedrela odorata* L., en nuestro país, estas no fueron incluidas por no haber suficiente presupuesto en este estudio para abarcar más poblaciones. Debido a esto las poblaciones muestreadas fueron seleccionadas en base a que estuvieran a menos de 150 km de la Ciudad de León.

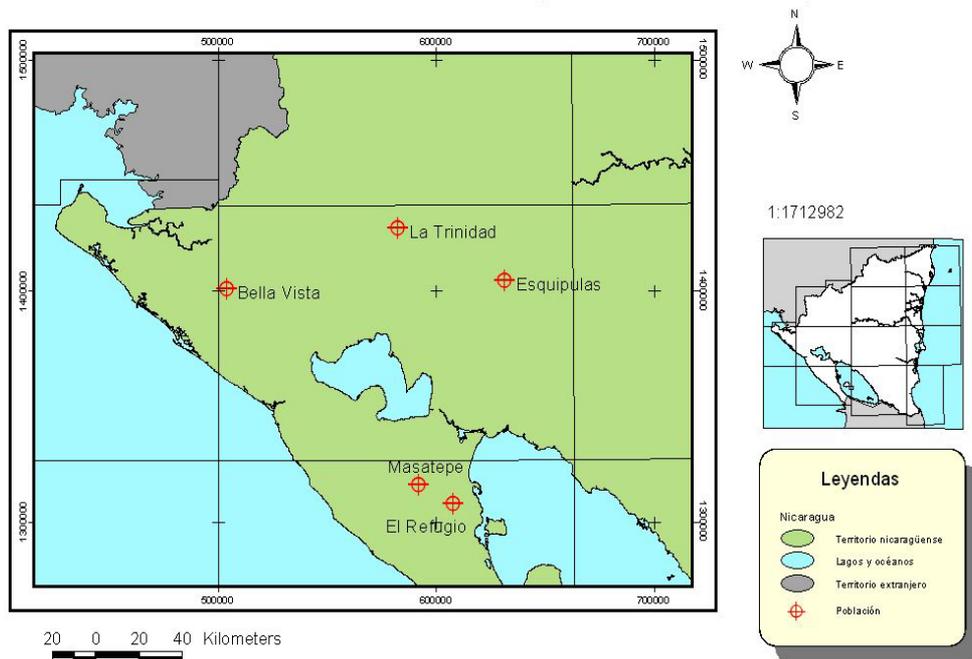
Tabla 1. Datos de los departamentos de Nicaragua donde ubican las poblaciones naturales *Cedrela odorata* L. muestreadas de este estudio

	Departamento	Coordenadas UTM		Altitud	CAS	ESQ	MAS	REF	TRI
		E	N						
CAS	Chinandega	503903	1401105	789	*	127.6 Km	122.8 Km	139.9 Km	83.1 Km
ESQ	Matagalpa	631620	1404864	668		*	97.8 Km	100.4 Km	53.7 Km
MAS	Masaya	591941	1316008	452			*	18.3 Km	112 Km
REF	Granada	607903	1307855	350				*	122.6 Km
TRI	Estelí	582827	1427319	629					*

Volcán Casita (CAS), Esquipulas (ESQ), Masatepe (MAS), El Refugio (REF), La Trinidad (TRI); coordenadas UTM; altitud (en msnm) y distancias entre poblaciones (en Km)



La colecta del material vegetal se realizó entre los meses de Julio y Agosto del 2007. Se tomaron los folíolos de hojas de árboles adultos con la ayuda de una tijera telescópica y se colocaron en bolsas plásticas con silica gel debidamente etiquetadas. La distancia entre árboles muestreados fue de 100 m. La media de árboles muestreados por procedencia fue de 18.4 (rango de 14-22). La distancia mínima entre poblaciones fue de 18.3 Km. Se representa en el siguiente mapa los lugares en que se hicieron las colectas.



Elaborado por Lic. David Cerda

Figura 2. Mapa indicando las poblaciones muestreadas de *Cedrela odorata* L. de Nicaragua.

Las muestras se depositaron en bolsas plásticas (con la ubicación de la población y el número de muestra) para su secado con silica gel de 3 a 5 días. Los folíolos deshidratados se pulverizaron en un mortero y se conservaron a -20 °C mientras se le realizaba la extracción de ADN.



4.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La extracción de ADN, se realizó a partir del procedimiento basado en el protocolo descrito por Möller et al. (1992), adaptado para *Cedreia odorata* L. en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, a través del Proyecto Marcadores 2006.

4.2.1. Protocolo

1. En un tubo Eppendorf de 2 ml se depositaron 0.04 g de material vegetal pulverizado para añadir 500 μ l de Buffer TES (Tris 100 mM pH= 8.0, EDTA 10 mM, SDS 2%) más 2 μ l de β -mercaptoetanol 14.4 M. Mezclar.
2. Incubar a 65° C en baño maría por 30 min, sacar los tubos para añadir 140 μ l de NaCl 5 M y 65 μ l de CTAB 10 %. Mezclar por inversión y continuar incubando por 10 min más.
3. Añadir 225 μ l de acetato de amonio 5 M y dejar por 30 min en hielo.
4. Agregar un volumen de cloroformo alcohol:isoamílico (24:1). Mezclar por inversión. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4° C.
5. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo y añadir aproximadamente un volumen de cloroformo alcohol:isoamílico (24:1). Mezclar por inversión. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4° C.
6. Transferir la fase superior acuosa a un nuevo tubo y añadir un volumen de isopropanol puro frío. Mezclar por inversión.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min a 4° C.
8. Lavar dos veces con etanol 70%. Después de la segunda lavada se deja el tubo abierto a temperatura ambiente para secar el sedimento.
9. Disolver el sedimento en una cantidad adecuada de TE (Tris 10 mM y EDTA 1 mM) dependiendo de la cantidad de sedimento.



10. Añadir 1 µl de ARNasa por cada 10 µl de muestra de ADN obtenida de la extracción. Incubar por 1 h a 37° C en baño maría.
11. Conservar el ADN a -20 ° C.

4.2.2. Chequeo y cuantificación del ADN extraído

Para verificar la presencia del ADN extraído se realizó un chequeo cualitativo mediante electroforesis en un minigel de agarosa al 0.8 % usando tampón TAE 1X (0.04 M Tris-acetato, 0.001 M EDTA) y una velocidad de migración electroforética de 5 V/cm. La muestra de ADN se colocó en los pocillos del gel con la ayuda de un tampón de carga (EDTA 10 mM, glicerol 20% y azul de bromofenol 0.25%). Después de la migración de aproximadamente 30 min, se verifica la presencia de ADN visualizándolo bajo luz ultravioleta a 260 nm, después de ser tiñendo el gel de 15 a 20 min en una solución de bromuro de etidio a 0.5 µg/ml.

Si los resultados son positivos las muestras se cuantifican preparando un factor de dilución de 200 (5 µl de la muestra y 995 µl de agua destilada) que se depositan en cubetas de cuarzo para determinar la concentración de ADN en un espectrofotómetro Lambda EZ201 (UV vis Spectrophotometer) a una absorbancia (A) de 260 nm. La concentración se calcula en µg/µl con la fórmula:

$$A_{260} \times \text{factor de dilución} \times 50$$

$$\frac{\quad}{1000}$$

Donde:

A_{260} = Absorbancia de la muestra a 260 nm

50 = Factor que indica que una absorbancia de 1.0 se tienen 50 µg/ml

1000 = Factor de conversión de ml a µl

Conocida la concentración del ADN extraído se diluye a 5 ng/ µl y se conservan a -20° C.



4.3. AMPLIFICACIONES DE ADN CON LA TÉCNICA RAPD

4.3.1. Selección de cebadores

Para esto, se utilizaron diferentes cebadores de la marca Operon Technologies, Inc. (OP), USA y de University of British Columbia, Vancouver, Canadá (UBC) que están disponibles en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, los cuales fueron ensayados en solo tres muestras de ADN para seleccionar entre ellos los que generaron mayor número de bandas de buena resolución y mayor polimorfismo.

Tabla 2. Designación y secuencia de los 31 cebadores ensayados en tres muestras de ADN de *Cedrele odorata* L. con la técnica RAPD

Cebadores	Secuencia 5' → 3'	Cebadores	Secuencia 5' → 3'
OPA-04	AAT CGG GCT A	OPK-18	CCT AGT CGA G
OPB-10	CTG CTG GGA C	OPM-04	GGC GGT TGT C
OPC-18	TGA GTG GGT G	OPM-05	GGG AAC GTG T
OPD-07	TTG GCA CGG G	OPN-09	TGC CGG CTT G
OPE-12	TTA TCG CCC C	OPN-12	ACC AGG GGC A
OPF-01	ACG GAT CCT G	OPQ-02	TCT GTC GGT C
OPF-05	CCG AAT TCC C	OPR-02	CAC AGC TGC C
OPG-10	AGG GCC GTC T	OPR-07	ACT GGC CTG A
OPH-07	CTG CAT CGT G	OPS-07	TCC GAT GCT G
OPH-18	GAA TCG GCC A	OPS-18	CTG GCG AAC T
OPJ-04	CCG AAC ACG G	OPT-08	AAC GGC GAC A
OPK-03	CCA GCT TAG G	OPU-16	CTG CGC TGG A
OPK-08	GAA CAC TGG G	UBC-223	GAT CCA TTG C
OPK-09	CCC TAC CGA C	UBC-228	GCT GGG CCG A
OPK-12	TGG CCC TCA C	UBC-411	GAG GCC CGT T
OPK-13	GGT TGT ACC C		



Para la selección de cebadores y la obtención de marcadores RAPDs en el total de las muestras colectadas, se utilizó una mezcla de reacción y un programa de Amplificación basado en el protocolo descrito por Williams *et al.*, (1990), adaptado para *Cedreia odorata* L., en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, a través del Proyecto Marcadores 2006.

4.3.2. Preparación de mezcla de reacción de Amplificación

En un tubo PCR de 0.5 ml se preparo un volumen final de 25 μ l de una solución con los siguientes componentes:

- Buffer PCR 1X (50 mM de KCl, 1.5 mM de MgCl₂, 10 mM de Tris-HCl pH =9)
- MgCl₂ 1.5 mM
- dNTPs a 200 μ M de cada dATP, dCTP, dGTP y dTTP
- Cebador o primer 0.2 μ M
- Taq polimerasa 1 U (Fisher Scientific).
- ADN 25 ng

4.3.3. Pasos de Amplificación de RAPD

Cada tubo de PCR se colocó en un termociclador Amplitron® II Thermolyne programado con los siguientes:

Desnaturalización inicial de 3 min a 92 °C, seguida por 45 ciclos de:

- Desnaturalización, 1min a 92 °C
- Hibridación, 2 min a 37 °C
- Extensión, 1 min a 72 °C

Extensión final de 8 min a 72 °C y a conservación a 4 °C por tiempo indefinido.



4.3.4. Chequeo de Amplificación

La muestra de ADN amplificada se mezcla con 5 μ l de tampón de carga para depositarla en los pocillos del gel de agarosa 2.0% sumergido en un tampón de TAE 1X. Además, se coloca en el primer pozo 10 μ l de marcador de ADN de peso molecular (DirectLoad™ Wide Range DNA Marker Sigma 1 kb). Una vez realizada la electroforesis a 5 V/cm, se tiñe el gel sumergido en una cubeta que contiene una solución de bromuro de etidio 0.5 μ g/ml por 15 a 20 min. Luego se coloca el gel sobre una lámpara UV (260 nm) para visualizar los fragmentos de ADN y fotografiarlos para su documentación.

4.4. ANÁLISIS DE DATOS

Se construyó una matriz presencia-ausencia, a partir de los patrones de bandas obtenidos para cada individuo con los 9 cebadores utilizados en este estudio, otorgándoles un valor de “1” a la presencia de banda y “0” a la ausencia de banda. Está fue analizada utilizando una prueba de correlación incluida en el programa SIMINT del paquete informático NTSYS 2.20, para conocer si habían bandas que estaban simultáneamente presentes o simultáneamente ausentes en los mismos individuos (Rohlf, 2005).

4.4.1. Proporción de Loci Polimórficos

Una medida de variación genética intrapoblacional es **la proporción de loci polimórficos** refiriéndose a la ocurrencia de las diferentes formas genéticas de un locus en la misma población.



Se calcula a partir de los patrones de bandas definidos de las amplificaciones RAPD dividiendo la frecuencia de loci polimórficos por el total de loci (polimórficos y monomórficos):

$$P = n_{pj}/n_{total} \quad [\text{ecuación 1}]$$

Donde:

P = proporción de loci polimórficos

n_{pj} = número de loci polimórficos

n_{total} = número total de loci (IPGRI y Cornell University, 2004).

Se calcula para cada cebador con todas las poblaciones y en cada población con todos los cebadores.

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

4.4.2. Diversidad Genética Intrapoblacional

Para estimar la diversidad intrapoblacional se utilizaron los marcadores RAPDs o bandas polimórficas en el conjunto de las muestras analizadas. La diversidad intrapoblacional se determinó calculando: la diversidad fenotípica y diversidad génica.

4.4.2.1. Diversidad Fenotípica (Hj)

Primero se considera las **frecuencias fenotípicas**: frecuencia de presencia de banda y frecuencia de ausencia de banda, para calcular h_i que es la diversidad del marcador i detectado por un determinado cebador. Se calcula utilizando el estadístico



no sesgado de Nei (1987), definido para bajo número de individuos como:

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

Donde:

n: número de individuos analizados en la población.

p_i : es la frecuencia del fenotipo i.

Luego se calcularon los valores de H_j que es la **diversidad por cebador** en cada población, con la finalidad de poder establecer comparaciones entre los niveles de diversidad detectados por cada cebador. Se calcula como:

$$H_j = \frac{\sum_r h_i}{r} \quad \text{[ecuación 3]}$$

Donde:

h_i : diversidad del marcador i detectado por un determinado cebador.

r: es el número de marcadores revelados por ese cebador.

Finalmente se calculó el valor de **diversidad fenotípica** (H_f) como la media de los valores H_j para obtener la **diversidad por población** con todos los cebadores utilizados.

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

4.4.2.2. Diversidad Génica (H_g)

Para calcular la diversidad génica se consideran las **frecuencias alélicas**: frecuencia del alelo dominante y frecuencia del alelo nulo. Para ello, cada banda fue



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

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

$$h_i = \frac{2n(1 - \sum_i p_i^2)}{2n - 1} \quad \text{[ecuación 4]}$$

Donde:

p_i : frecuencia del alelo i en la población analizada.

n : número de individuos analizados de dicha población.

La **diversidad génica en la población (H_g)**, se calculó promediando los valores h_i obtenidos para todos los loci analizados. Estas estimaciones se realizaron utilizando el programa informático TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

Para realizar una comparación estadística de las distribuciones medias poblacionales entre las diversidades fenotípicas y génica se utilizó el test de la t para muestras apareadas del paquete estadístico STATGRAPHICS Plus ver 5.1.

4.4.3. Diferenciación Entre Poblaciones

La diferenciación entre las poblaciones se puede estimar tanto en términos de la diversidad fenotípica como en término de las distancias genéticas entre poblaciones.

4.4.3.1. Estimación en Términos de la Diversidad Fenotípica

La estimación la diversidad interpoblacional o coeficiente de diferenciación entre poblaciones (G_{ST}) para cada cebador, requiere previamente del cálculo de de la



diversidad intrapoblacional media (H_{pop}) y de la diversidad total (H_T). Estos análisis se realizaron para cada cebador basándose en lo descrito por Nei (1987), de la siguiente manera:

1. Cálculo de la diversidad intrapoblacional media (H_{pop}):

$$H_{POP} = \frac{1}{n} \sum_n H_j \quad \text{[ecuación 5]}$$

Donde:

H_j : es la diversidad por cebador.

n : es el número de poblaciones.

2. La diversidad total (H_T), estimada como indica en la ecuación 2 pero a partir de las frecuencias de cada fenotipo en el conjunto de la muestra analizada. Es decir, se hicieron tantas matrices como cebadores, pero los datos se introdujeron de tal forma como si fuesen de una única población.

3. El componente de diversidad intrapoblacional.

$$\frac{H_{POP}}{H_T} \quad \text{[ecuación 6]}$$

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

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_{POP}}{H_T} \quad \text{[ecuación 7]}$$

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



4.4.3.2. Estimación en Términos de Distancias Genéticas. Análisis de la varianza molecular (AMOVA)

La información proporcionada por los marcadores RAPDs se utilizó siguiendo el procedimiento desarrollado por Excoffier et al. (1992), aplicado a fenotipos según Huff et al. (1993). Se analizaron fenotipos globales teniendo en cuenta todos los marcadores detectados. Los fenotipos fueron comparados dos a dos para determinar una medida de la distancia entre ellos. La distancia empleada fue calculada como el número de bandas no compartidas por los dos fenotipos comparados que es equivalente a una distancia euclidiana al cuadrado (δ_{ij}^2). De esta manera se construyó una matriz de distancias entre todos los fenotipos analizados.

La idea central de la AMOVA es utilizar la matriz de distancias para realizar un análisis de varianza para los fenotipos obtenidos donde se extraen sus dos componentes: varianza entre individuos pertenecientes a una misma población y varianza entre individuos entre poblaciones. Véase el diseño del análisis en la Tabla 3.

Tabla 3. Diseño del Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

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



Donde:

P: es el número de poblaciones

N: es el número de individuos

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

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

MSD(T): media total de las desviaciones al cuadrado

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

$$n = \frac{N - \sum_p \frac{N_p^2}{N}}{P - 1} \quad \text{[ecuación 8]}$$

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

$$SSD_{(T)} = \frac{1}{4} \sum_{j=1}^N \sum_{k=1}^N \delta_{jk}^2 \quad \text{[ecuación 9]}$$

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

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

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_T^2} \quad \text{[ecuación 10]}$$

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



También se obtuvo una matriz con los valores Φ_{ST} entre cada par de poblaciones, que permite medir el grado de diferenciación entre las poblaciones estudiadas. Estos valores se determinan mediante la correlación entre pares de fenotipos tomados al azar de una misma población, con respecto a la de pares de fenotipos tomados al azar del total de la muestra estudiada. Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa informático Arlenquín 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005).

4.4.4. Relaciones Filogenéticas

La matriz de valores Φ_{ST} fue convertida en una matriz de distancias genéticas análogamente a lo propuesto por Reynolds *et al.* (1983), para valores F_{ST} utilizando el programa Arlenquín 3.01:

$$D = -\ln(1 - \Phi_{ST}) \quad [\text{ecuación 11}]$$

Para construir el dendrograma de relaciones filogenéticas se utilizaron los siguientes programas estadísticos:

El programa NEIGHBOR del paquete informático PHYLIP 3.65 (Felsenstein, 2004), para aplicar el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) a los valores de distancia genética.

El programa informático TreeView 1.6.6 (Page, 1996) para lograr una mejor presentación del gráfico (dendrograma).

El programa NJOIN del software NTSYS 2.20 (Rohlf, 2005), se utilizó para probar la bondad de ajuste del dendrograma resultante con la matriz de valores de distancias genéticas. Para ello, primero en formato NTSYS se construyó el mismo dendrograma



introduciendo la matriz de coascendencia de Reynolds et al. (1983). Luego con el comando CPH del mismo software se extrajo del dendrograma la matriz cofenética y utilizando el programa MAXCOMP incluido en NTSYS 2.20 (Rohlf, 2005), se realizó una comparación con la matriz original de los valores de distancias genéticas (Sneath y Sokal, 1973), mediante una prueba de correlación producto-momento. Realizando un análisis permutacional de Mantel (1967), con 1000 permutaciones, se determinó el nivel de significancia de esta prueba. Este programa también fue utilizado para comprobar si existía o no correlación positiva entre distancias genéticas (matriz de distancias de coascendencia) y distancias geográficas entre poblaciones individuales.



V

Resultados Y

Discusión



Hamrick et al. (1997), citado en el 2008 por Hernández, describe que se espera altos niveles de variación genética en las especies con grandes rangos de distribución, altos niveles de fecundación cruzada, alta fertilidad, sistema de polinización por el viento, largos periodos de generación, y que ocurren en hábitats que representan avanzados estados de sucesión.

Tales características son aplicables para la especie de *C. odorata* excepto la polinización por viento, debido a que la especie es polinizada por pequeñas polillas, abejas y avispas, y sus semillas son dispersadas por el viento. Análisis del sistema de apareamiento confirma que *C. odorata* es una especie de fecundación cruzada obligada a través de todos los linajes del Norte y Centro, así como posiblemente a través de los linajes del Sur. La autofecundación en árboles de *C. odorata* ocurren muy raramente por lo que las semillas de las plantas son el producto de la polinización cruzada lo que contribuye a producir altos niveles de diversidad genética.

El método RAPD está siendo utilizado con éxito para determinar los niveles y modelos de diversidad genética tanto en especies sexuales como clonales. Enrech (2000), señala que Chalmes y col. en el año 1992, fueron los primeros en realizar un trabajo sobre la utilización de los marcadores RAPDs para estimar la variación genética intra e interpoblacional en poblaciones naturales de especies forestales (*Gliricidia*).

Al iniciarse un estudio con aplicación de este método, deben establecerse las condiciones óptimas en los dos pasos fundamentales del proceso: extracción de ADN y amplificaciones de ADN (Enrech, 2000). Previos a este trabajo, estos procesos fueron optimizados a través del Proyecto Marcadores 2006.



Basado en que *Cedrela odorata* L. se caracteriza por lo citado anteriormente, los análisis de los resultados que se presentan a continuación se realizaron bajo el supuesto de que las poblaciones están en equilibrio de Hardy-Weinberg.

5.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Se realizó la extracción de ADN en las 92 muestras colectadas de *Cedrela odorata* L. basado en el procedimiento descrito por Möller et al. (1992), adaptado para esta especie. Cuya presencia se chequeo en minigel de Agarosa 0.8%.

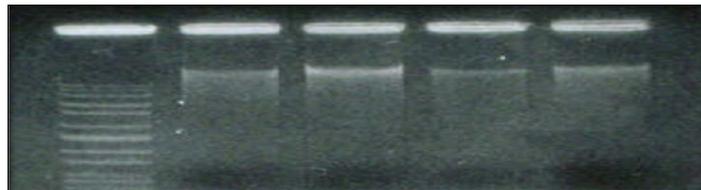


Figura 3. ADN extraído de 4 muestras de *Cedrela odorata* L. de la población Casita

Se cuantificó por Espectrofotometría la concentración de las muestras obteniéndose un rango mínimo de 70 ng/μl y máximo 19.820 ng/μl. Realizando un solo proceso de Extracción se obtuvo ADN en cantidades suficientes para utilizarlos en las Amplificaciones RAPDs de este estudio. Esto fue una gran ventaja para este estudio donde se realizaron las colectas en lugares distantes.

5.2. AMPLIFICACIONES RAPDs

Debido a que los cebadores que se utilizan en la técnica RAPD se complementan al azar en el genoma a amplificar (Loo *et al.*, 1999), y aunque en muchos de ellos aparecen polimorfismos entre los genotipos analizados (Enrech, 2000), no todos amplifican por no poseer secuencias complementarias en el ADN, por lo que



hay que ensayar un conjunto de cebadores para seleccionar entre ellos aquellos que generen bandas de buena resolución para detectar así mayor número de polimorfismos entre los genotipos analizados, lo que garantiza obtener datos más confiables en estudios de caracterización de variabilidad (Khasa *et al.*, 1996). (Figura 4).

De los 31 cebadores ensayados, 9 produjeron patrones definidos y bandas de buena resolución, los que se utilizaron en el total de los 92 individuos muestreados. En la siguiente tabla se presentan los 9 cebadores **seleccionados** utilizados en este estudio.

Tabla 4. Designación y secuencia de los cebadores empleados en este estudio

Cebador o Primer	Secuencia 5' – 3'	Bandas Polimórficas	Bandas Monomórficas	Bandas Totales	Rango de peso molecular (pb)
OPF-01	ACG GAT CCT G	8	3	11	450-2000
OPG-10	AGG GCC GTC T	5	6	11	670-3000
OPN-09	TGC CGG CTT G	4	7	11	270-1300
OPR-07	ACT GGC CTG A	12	1	13	370-3000
OPS-18	CTG GCG AAC T	6	7	13	400-3700
OPT-08	AAC GGC GAC A	10	0	10	450-2700
OPU-16	CTG CGC TGG A	8	2	10	500-2000
UBC-228	GCT GGG CCG A	14	1	15	500-2000
UBC-411	GAG GCC CGT T	11	3	14	350-3000
Total		78	30	108	-
Media por cebador		8.67	3.33	12	-

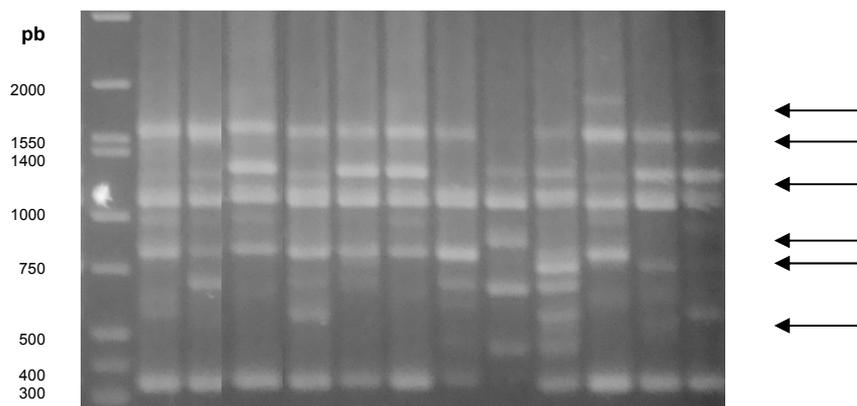


Figura 4. Amplificaciones RAPD con el Cebador OPS-18 en muestras de *C. odorata* de la población el Volcán Casita. En la línea 1 se presenta el Marcador de Peso Molecular. Las flechas señalan las bandas polimórficas



El número de bandas varió desde 10, obtenido por igual con los cebadores OPT-08 y OPU-16, a 15 con el cebador UBC-228. La media de bandas por cebador fue de 12. Los 9 cebadores generaron un total de 108 bandas con tamaños que variaron de 3700 a 370 pb, de los cuales 78 fueron bandas polimórficas. Estos resultados están dentro del rango que recomiendan Nybom y Bartish (2000), de usar al menos 50 a 100 o más marcadores polimórficos, lo que significa que se obtuvieron una cantidad de datos RAPD fiables en este estudio.

En el estudio realizado por Gilles et al. (1997b), utilizando RAPD en poblaciones costarricense de *C. odorata* con 14 cebadores, obtuvieron un total de 97 bandas polimórficas en 68 muestras pertenecientes a 10 diferentes localidades. La diferencia de datos con este estudio se debe a que aunque ellos utilizaron menos muestras, obtuvieron mayor número de bandas polimórficas, debido a que utilizaron mayor número de cebadores.

Cada cebador amplifica varios segmentos de ADN debido a que su corta longitud incrementa la posibilidad de que en varios lugares del genoma, se hibrida el cebador simultáneamente a distancias amplificables distintas, que permiten la síntesis de fragmentos de ADN de diversos tamaños (Kernodle *et al.*, 1993). El número y tamaño de los fragmentos generados estrictamente depende de los nucleótidos del cebador y de la muestra de ADN usada, resultando en un patrón de bandas específico (Klein *et al.*, 1991).

5.3. Proporción de Loci Polimórficos

En este estudio para definir los patrones de bandas específicos de los genotipos con cada cebador ensayado, se tomó el criterio citado en Fontedevila y Moya (1999), de que un locus es polimórfico (presente en unos individuos y ausentes en otros) cuando la



frecuencia del alelo raro en la población es superior al 0.05, aplicando así este criterio a las bandas polimórficas que aparecían en unos pocos genotipos. A partir de los patrones de bandas se obtuvo la proporción de bandas polimórficas, la que se calcula en cada cebador con todas las poblaciones y en cada población con todos los cebadores; dividiendo el número de bandas polimórficas que se presenten entre el total de bandas obtenidas. Estos resultados se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 5. Número y porcentaje de bandas polimórficas obtenidas con RAPD.

Cebadores	Poblaciones					Media de todas las poblaciones
	CAS	ESQ	MAS	REF	TRI	
OPF-01	7 (63.34)	7 (63.34)	8 (72.73)	7 (63.34)	7 (63.34)	7.2 (65.45)
OPG-10	5 (45.45)	4 (36.36)	5 (45.45)	4 (36.36)	5 (45.45)	4.6 (41.81)
OPN-09	3 (27.27)	4 (36.36)	4 (36.36)	2 (18.18)	2 (18.18)	3 (27.27)
OPR-07	9 (69.23)	12 (92.30)	12 (92.30)	11 (84.11)	12 (92.30)	11.2 (86.15)
OPS-18	6 (46.15)	6 (46.15)	4 (30.77)	4 (30.77)	5 (38.46)	5 (38.46)
OPT-08	6 (60.00)	10 (100.00)	9 (90.00)	10 (100.00)	7 (70.00)	8.4 (84.00)
OPU-16	7 (70.00)	8 (80.00)	7 (70.00)	8 (80.00)	8 (80.00)	7.6 (76.00)
UBC-228	10 (66.67)	13 (86.67)	13 (86.67)	14 (93.33)	8 (53.33)	11.6 (77.33)
UBC-411	11 (78.57)	10 (71.43)	11 (78.57)	10 (71.43)	7 (50.00)	9.8 (70.00)
Media de todos los cebadores	64 (59.26)	74 (68.51)	73 (67.59)	70 (64.81)	61 (56.48)	68.4 (63.33)

Volcán Casita (CAS), Esquipulas (ESQ), Masatepe (MAS), El Refugio (REF), La Trinidad (TRI)



En el análisis de cada cebador con todas las poblaciones, todos los cebadores produjeron bandas polimórficas, siendo los de mayor porcentaje promedio el cebador OPR-07 con una media de 86.15%, seguido del cebador OPT-08 con 84.00%, lo que significa que fue alta la frecuencia de hibridaciones de estos cebadores en las muestras analizadas y de menor porcentaje fue el OPN-09 con 27.27%.

En cuanto al análisis de cada población con todos los cebadores, se observa que todas las 78 bandas polimórficas en el conjunto de la muestra analizada fueron también polimórficas dentro de cada población, con valores promedios máximo de 68.51% en la población de Esquipulas y mínimo de 56.48% en la población de La Trinidad, siendo 63.33% el valor medio de todas las poblaciones.

Debido a que estos datos se obtienen tomando en cuenta sólo a las bandas polimórficas producidas por los cebadores, éstas representan las variaciones por mutaciones en los sitios donde el cebador no encontró complementariedad para hibridar en el genoma a amplificar, resultando de estos cambios en la presencia o ausencia de un segmento RAPD (Whitkus *et al.*, 1994). Por el carácter dominante de los marcadores RAPDs, no es posible distinguir cuando un segmento de ADN ha sido amplificado de un locus heterocigoto u homocigoto por lo que estos marcadores al expresarse como presencia o ausencia de una banda amplificada se traduce en una pérdida de información genética (Enrech, 2000).

5.4. DIVERSIDAD GENÉTICA INTRAPOBLACIONAL

5.4.1. Diversidad fenotípica (H_j)

Una de las medidas para estimar la diversidad intrapoblacional, fue calcular las frecuencias fenotípicas (H_j) en cada una de las 5 poblaciones, para cada cebador



aplicado en este estudio. Estos resultados se encuentran en la Tabla 6.

Tabla 6. Estimaciones de la diversidad fenotípica intrapoblacional obtenidas con cada cebador (H_j) y los valores medios (H_f) considerando todos los cebadores para cada población con RAPD

Cebadores	Poblaciones				
	CAS	ESQ	MAS	REF	TRI
OPF-01	0.241 ± 0.162	0.375 ± 0.227	0.428 ± 0.255	0.410 ± 0.246	0.326 ± 0.208
OPG-10	0.445 ± 0.290	0.361 ± 0.341	0.344 ± 0.213	0.242 ± 0.280	0.514 ± 0.329
OPN-09	0.244 ± 0.195	0.399 ± 0.275	0.247 ± 0.195	0.195 ± 0.165	0.200 ± 0.172
OPR-07	0.332 ± 0.196	0.409 ± 0.231	0.405 ± 0.230	0.332 ± 0.193	0.401 ± 0.234
OPS-18	0.364 ± 0.238	0.354 ± 0.229	0.216 ± 0.157	0.254 ± 0.178	0.311 ± 0.213
OPT-08	0.247 ± 0.158	0.401 ± 0.232	0.281 ± 0.173	0.379 ± 0.222	0.256 ± 0.164
OPU-16	0.334 ± 0.210	0.367 ± 0.223	0.349 ± 0.215	0.347 ± 0.214	0.391 ± 0.242
UBC-228	0.310 ± 0.181	0.373 ± 0.209	0.443 ± 0.245	0.321 ± 0.184	0.212 ± 0.132
UBC-411	0.424 ± 0.246	0.387 ± 0.222	0.468 ± 0.264	0.168 ± 0.112	0.251 ± 0.158
Todos los cebadores (H_f)	0.326 ± 0.169	0.383 ± 0.194	0.372 ± 0.190	0.304 ± 0.156	0.309 ± 0.162

Volcán Casita (CAS), Esquipulas (ESQ), Masatepe (MAS), El Refugio (REF), La Trinidad (TRI)

De todos los cebadores utilizados, sólo OPU-16 fue el que generó niveles más similares de diversidad dentro las poblaciones, el resto de los cebadores presenta diferentes frecuencias fenotípicas, destacándose más el cebador OPG-10 con un mínimo de $H_j=0.242$ en la población de El Refugio y un máximo de $H_j=0.514$ en La



Trinidad. Lo ideal en RAPD es que los cebadores den frecuencias fenotípicas similares y no tan variables por lo que se recomienda usar mayor número de cebadores para producir datos más estables y así minimizar un posible sesgo que produce este tipo de marcadores en el análisis intrapoblacional.

El valor medio que se obtuvo de cada población, con todos los cebadores (Tabla 6), indica los valores medios de la **diversidad fenotípica (H_f)**, señalando que estos valores fueron similares entre sí ya que osciló entre el rango de $H_f=0.304$ en la población de La Trinidad y de $H_f=0.383$ en Esquipulas. El valor medio en total de las cinco poblaciones fue de $H_f= 0.338$.

5.4.2. Diversidad génica (H_g)

En la tabla 7 se presentan para cada población, los valores medios de la diversidad génica (frecuencias alélicas) por locus (H_g), comparándolos con los valores medios de porcentajes de polimorfismo (P_t = sobre el total de bandas o proporción de loci polimórficos de la Tabla 4 y P_p = sobre el total de bandas polimórficas) y diversidad fenotípica (H_f) de la Tabla 5.

Con esta otra medida de la diversidad intrapoblacional se obtuvo un valor medio para la diversidad génica de 0.311, siendo la población de Esquipulas la que presentó menor grado con un $H_g=0.295$ y La Trinidad la mayor con un $H_g=0.333$. Al comparar estos valores con los de la diversidad fenotípica (H_f) por población, se observa que estos últimos fueron ligeramente superior para las poblaciones del Volcán Casita, Esquipulas y Masatepe, y lo contrario sucedió con las poblaciones de EL Refugio y La Trinidad (Tabla 7 y Figura 4).



Tabla 7. Valores de polimorfismo y diversidad obtenidas con RAPD en las 5 poblaciones analizadas. Entre paréntesis error típico

Población	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo sobre el total de bandas	Porcentaje de polimorfismo sobre el total de bandas polimórficas	Diversidad fenotípica media por cebador (H_f)	Diversidad génica media por locus (H_g)
Casita	64	59.26	82.05	0.326 (0.025)	0.305 (0.020)
Esquipulas	74	68.51	94.87	0.383 (0.006)	0.295 (0.020)
Masatepe	73	67.59	93.59	0.372 (0.030)	0.300 (0.019)
El Refugio	70	64.81	89.74	0.304 (0.028)	0.323 (0.019)
La Trinidad	61	56.48	78.20	0.309 (0.034)	0.333 (0.020)
Media	68.4	63.33	87.69	0.339 (0.016)	0.311 (0.007)

Diversidades fenotípicas y génicas por población

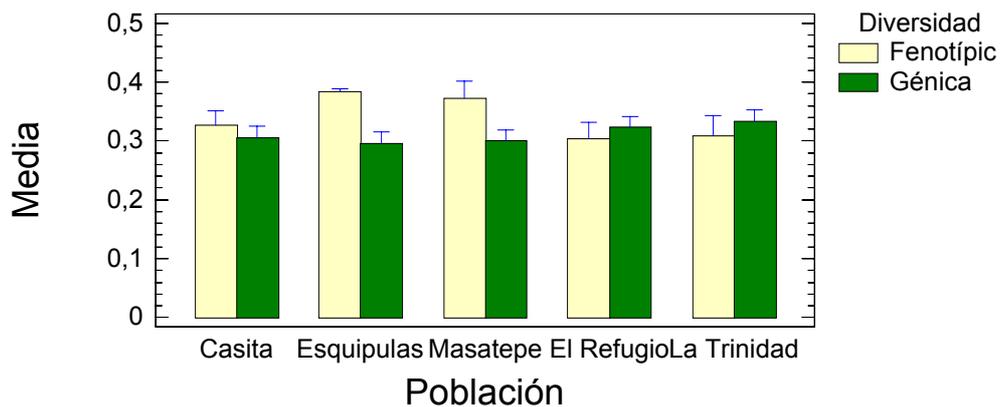


Figura 5. Representación de las estimaciones de diversidad fenotípica y diversidad génica encontrada en marcadores RAPDs en *Cedrela odorata* L.



Al comparar la media de la diversidad fenotípica resultó bastante similar ($H_f=0.339$), a la de la diversidad génica ($H_g=0.311$).

Al aplicar la prueba t cuya hipótesis nula es que $H_f - H_g$ media es igual a 0 frente a la hipótesis alternativa en la que $H_f - H_g$ media no es igual a 0. Puesto que el P-valor ($P=0.294713$) para este test ($t=1.20472$) es superior o igual a 0.05, podemos rechazar la hipótesis nula para un nivel de confianza del 95.0%.

El coeficiente de correlación (r) es igual a -0.879 ($P<0.05$), lo que indica una correlación positiva entre las variables, la cual es estadísticamente significativa.

Gilles et al. (1997b), en su estudio con marcadores RAPDs en poblaciones costarricenses, también presentan los valores medio de cada población analizada con todos los cebadores usando el Índice de Diversidad de Shannon. A diferencia de este estudio, que dentro de las poblaciones se obtuvo valores de Diversidad Fenotípica similares, ellos reportan niveles distintos de estos valores dentro de las poblaciones con un rango máximo de 1.897 en una población en el Pacífico Norte y un mínimo de 1.181 en una población en el Atlántico. Estas diferencias con respecto a este estudio podría deberse a que el muestreo de las poblaciones costarricense incluyó material de dos regiones diferentes del país Pacífico Norte y Atlántico/Pacífico Sur, donde estas poblaciones están adaptadas a distintas condiciones ambientales, ya que la región del Atlántico/Pacífico Sur recibe gran cantidad de lluvia mientras que la del Pacífico Norte experimenta un gran número de meses seco.

Los estudios en *C. odorata* con marcadores de Cloroplasto y AFLP por Cavers et al. (2003a), ambos en poblaciones costarricenses de *C. odorata*, no reportan estos tipo de análisis que mide la diversidad intrapoblacional, ya que no presenta resultados, ni de la diversidad fenotípica, ni de la génica para compararlos con este estudio. Así como



tampoco se reportan este tipo de análisis en el estudio de marcadores AFLP realizado por De la Torre et al. (2008), en poblaciones de *C. odorata* de la Amazona Peruana.

5.5. DIFERENCIACIÓN ENTRE POBLACIONES

La variación genética puede ocurrir en tres niveles jerárquicos: i) dentro de la población, ii) entre las poblaciones de la misma especie, y iii) entre las diferentes especies. Separando del mismo modo la variación genética en tres componentes: i) la diversidad genética (la cantidad de variación genética), ii) diferenciación genética (la distribución de la variación genética entre las poblaciones), y iii) la distancia genética (la cantidad de variación genética entre pares de poblaciones). Entendida como la variación de los genes hereditarios en los organismos biológicos, la diversidad genética puede ser medida en el plano individual, en la población y a nivel de especie (Hernández, 2008).

5.5.1. Estimación en términos de la diversidad fenotípica

A partir de los valores de la diversidad fenotípica intrapoblacional (H_j) con cada cebador se obtiene: la diversidad fenotípica intrapoblacional media por población revelados por cada cebador (H_{pop}); los correspondientes valores en el conjunto de la muestra analizada (H_T), la proporción de la diversidad total atribuible a diferencias dentro de poblaciones (H_{pop}/H_T) y las diferencias entre poblaciones (G_{ST}).

El valor medio interpoblacional (0.069) obtenido con los 9 cebadores utilizados, indica que el 6.9% de la diversidad es atribuible a diferenciación entre poblaciones, mientras que el valor medio intrapoblacional (0.931) señala que el 93.1% restante de la diversidad es debido a los individuos dentro de una misma población. Estos datos se muestran en la Tabla 8.



Tabla 8. Diversidad intrapoblacional (H_{POP}/H_T) e interpoblacional (G_{ST}) con 9 cebadores RAPD en las 5 poblaciones muestreadas y los correspondientes valores medios

Cebador	H_{POP}	H_T	H_{POP}/H_T	G_{ST} ($H_T - H_{POP}/H_T$)
OPF-01	0.356	0.413	0.862	0.138
OPG-10	0.381	0.372	1.024	-0.024
OPN-09	0.257	0.290	0.886	0.114
OPR-07	0.376	0.390	0.964	0.036
OPS-18	0.300	0.376	0.798	0.202
OPT-08	0.313	0.216	1.449	-0.449
OPU-16	0.358	0.375	0.955	0.045
UBC-228	0.332	0.391	0.849	0.151
UBC-411	0.340	0.414	0.821	0.179
Media	0.335	0.360	0.931	0.069

Los mayores valores intrapoblacionales obtenidos con los cebadores OPG-10 y OPT-08, muestran que existen más diferencias entre individuos de una misma población que entre individuos de distintas poblaciones. OPS-18 con un valor interpoblacional (0.202) fue el cebador que más diferenciación dio entre poblaciones.

Este tipo de análisis realizado en el estudio de Gilles et al. (1997b), para los valores calculados de diversidad dentro de las poblaciones se encontró que variaban de acuerdo a los cebadores, con un cebador se determinó que un 45% del total de la diversidad era evidente dentro de las poblaciones, mientras que con otro, se encontró un valor del 63%. Contrario a lo obtenido en nuestros análisis RAPD para la diferenciación fenotípica, en este estudio, se obtuvo mayor variación interpoblacional (55%) que intrapoblacional (45%) (no así para el Análisis Molecular de la Varianza cuyos resultados se presentan más adelante). Ellos justifican haber encontrado mayor variación entre poblaciones debido a que estas pertenecían a la zona seca y húmeda de Costa Rica.



El estudio en 2 grupos de poblaciones de *C. odorata* costarricense de Cavers et al. (2003a), con AFLP reporta un G_{ST} alto de 0.98. Otro estudio realizado por estos mismos autores, con ADN de cloroplasto para conocer el nivel de distribución de la diversidad de *C. odorata* en poblaciones de Mesoamerica, colectadas de los países de México, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, reportan un nivel de diferenciación interpoblacional de 0.96, siendo uno de los más alto obtenidos cuando lo comparan con los obtenidos en otras especies como *Quercus sp.* ($G_{ST}=0.828$), *Vouacapoua americana* ($G_{ST}=0.89$), *Argania espinosa* ($G_{ST}=0.60$).

En este estudio el valor interpoblacional obtenido fue bajo comparado a los altos valores reportados por Cavers y colaboradores. Esto lógicamente puede deberse a que las poblaciones muestreadas en Nicaragua son todas de la Región del Pacífico. En cambio, es de esperarse que entre las distintas poblaciones Mesoamericanas que fueron designadas en tres linajes diferentes: Norte (México, Guatemala), Central (Honduras, Nicaragua, y noroeste Costa Rica) y Sur (este y suroeste de Costa Rica y Panamá), y en el caso del estudio que solo incluye las poblaciones costarricenses, estas pertenecen a dos ecotipos diferentes y además al distanciamiento geográfico entre ellas.

5.5.2. Estimación en términos de distancia genéticas

Esta estimación se realiza a partir de un Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) para los fenotipos obtenidos, donde se extraen sus dos componentes: varianza entre individuos pertenecientes a una misma población y varianza entre individuos entre poblaciones.

En la Tabla 9 se muestran los resultados del Análisis Molecular de la Varianza (AMOVA) donde se encontró también que es mayor el porcentaje de variación (86.19%) dentro de las poblaciones, que entre poblaciones (13.81%). Los valores de $P<0.001$



obtenido del análisis entre y dentro de la poblaciones sugiere que existe variación significativa, tanto entre las 5 poblaciones como dentro de los individuos de cada una de las poblaciones.

Tabla 9. Resultados del análisis de AMOVA en las 5 poblaciones muestreadas de *Cedreia odorata* L. usando RAPD

Fuente de variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Estadístico Φ
Entre poblaciones	4	209.855	2.13930	13.81***	$\Phi_{ST} = 0.1381$
Dentro de poblaciones	87	1161.591	13.35162	86.19***	
Total	91	1371.446	15.49092		

*** $P < 0.001$

Test de significancia después de 1000 permutaciones

A pesar de que el estudio RAPD de *C. odorata* en poblaciones costarricense (Gillies *et al.*, 1997b), encontró mayor variación interpoblacional con respecto a los valores intrapoblacional, los datos del análisis de AMOVA resultaron lo contrario, ya que se determinó que la mayoría del total de variación puede ser atribuida a las diferencias dentro de las poblaciones (65.1%), y que una cantidad significativa también fue atribuida a la variación entre las poblaciones de 2 zonas distintas pertenecientes a las regiones del Pacífico Norte y Atlántico/Pacífico Sur (35.3%). Otro estudio en poblaciones colectadas a lo largo del territorio de Costa Rica con marcadores AFLP los análisis de AMOVA demostraron una alta variación (83.5%) entre grupos de poblaciones pertenecientes al este y sur este de Costa Rica, una pequeña cantidad de variación fue encontrada entre poblaciones dentro de los grupos (5.4%), aumentando un poco la variación dentro de las poblaciones (11.2%) (Cavers *et al.*, 2003a).



Resultados similares se presentan en el estudio AFLP en poblaciones de *C. odorata* de dos áreas protegidas distintas de la Amazona Peruana: Parque Nacional Manu y Área Conservada Los Amigos (De la Torre *et al.*, 2008), donde la mayor variación (72.7%) fue dentro de las poblaciones, obteniéndose menores porcentaje de variación tanto entre poblaciones dentro de los grupos (10.80%) como entre grupos (16.48%).

A diferencia de este estudio, los resultados presentados en el párrafo anterior se obtuvieron analizando poblaciones pertenecientes a regiones distintas por lo que éstos presentan datos de variación entre grupos o zonas analizadas. Al comparar la presencia de variación dentro de grupo de estos estudios, vemos que todos presentan como es de esperarse, mayor variación dentro de las poblaciones a excepción del estudio de Cavers *et al.* (2003a), aunque cuando ellos presentan sus datos de AMOVA separados por Haplotipos A y B analizados, resulta que es mayor la variación dentro de las poblaciones (A=79.8 y B=52.6).

Estudios RAPDs en otras especies forestales como los realizado en *Ilex paraguariensis* (Gauer y Cavalli-Molina, 2000), en *Pinus oocarpa* (Díaz, 2001), *P. tecunumanii* (Cerdeira, 2007), entre otros han demostrado que la mayor variabilidad genética es intrapoblacional que interpoblacional. Según Hamrick (1990), citado por Enrech (2000), es lo esperado en especies de plantas maderables perennes de larga vida y de fecundación cruzada.

También el AMOVA permitió calcular el valor de Φ_{ST} que mide el grado de diferenciación entre todas las poblaciones, resultando un valor de 0.1381 (13.8%), el cual es mayor que el valor entre las poblaciones estimado a partir de las diversidades fenotípicas ($G_{ST}=0.069$) ó 6.9%. (Tabla 9 y 8 respectivamente).



Los valores máximos observados de los estadísticos G_{ST} y Φ , análogos a los F de Wright (F_{ST}) generalmente son mucho menor que uno. Presentan un rango de $0 < F_{ST} < 1$, donde 0 = no hay divergencia genética y 1 = fijación de un alelo diferente en cada población. Los siguientes rangos de F_{ST} determinados por Wright (1978), son los siguientes:

- Pequeña: de 0 a 0.05
- Moderada: de 0.05 a 0.15
- Grande: de 0.15 a 0.25
- Muy grande >0.25

De acuerdo a esto, en las 5 poblaciones de *C. odorata* se encontró una moderada diferenciación tanto con los valores obtenidos utilizando diversidades fenotípicas ($G_{ST}=0.069$), como los obtenidos con AMOVA ($\Phi_{ST}=0.1381$).

El estudio de Gillies et al. (1997b), no reportan valores Φ_{ST} en sus análisis de AMOVA. De la Torre et al. (2008), reportan valores análogo de F_{ST} para todas las poblaciones de los 2 grupos de *C. odorata* de la Amazona Peruana analizados, con un valor grande de 0.20. Cavers et al. (2003a), reporta estos valores para los 2 grupos de las poblaciones costarricense analizadas de $\Phi_{ST}= 0.20$ y 0.47, los cuales resultaron en diferenciación genética grande y muy grande respectivamente.

Al comparar el grado de diferenciación de este estudio con los mencionados anteriormente, estos últimos fueron mucho más altos, debido a que se empleó la técnica AFLP que produce información de regiones no metiladas del genoma que también son codificantes (también hay regiones repetidas no metiladas, pero en menor medida), igualmente utilizan sistemas de geles más fiables puesto que poseen mayor poder de resolución, como son los geles de poliacrilamida. En cambio, los RAPDs que están ampliamente distribuidos en el genoma, cuyo contenido es principalmente no codificante, revelan información mayoritaria de estas secuencias que al no estar



sometidas a selección natural tienen mayores índices de mutaciones (Díaz y Ferrer, 2003).

Todos estos resultados basados en los valores Φ_{ST} que mide el grado de diferenciación entre todas las poblaciones, indican que *C. odorata* puede tener tendencia a desarrollar una diferenciación marcada entre las poblaciones. Probablemente, la alta diferenciación podría deberse a las características intrínsecas de la especie, tales como su amplio rango de distribución, rápido crecimiento, polinización por insectos capaces de volar largas distancias, semillas dispersadas por el viento, y fecundación cruzada, combinado con factores sociales y económicos tales como la valoración de los árboles de *C. odorata*, permitiendo su regeneración natural de las especies como cercas vivas, establecimiento de plantaciones, sistema de agroforestería, pueden explicar altos niveles de diversidad genética (Hernández, 2008).

5.5.3. Diferenciación entre pares de poblaciones

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

En la Tabla 10 se presentan los valores Φ_{ST} entre todos los pares de poblaciones, para conocer las relaciones en cuanto a la mayor o menor diferenciación existente entre ellas.



Tabla 10. Valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones obtenidos a partir de RAPD.

	CAS	ESQ	MAS	REF	TRI
CAS	0				
ESQ	0.081	0			
MAS	0.154	0.062	0		
REF	0.197	0.116	0.093	0	
TRI	0.241	0.188	0.173	0.152	0

Volcán Casita (CAS), Esquipulas (ESQ), Masatepe (MAS), El Refugio (REF), La Trinidad (TRI).

Sin embargo, en este estudio el coeficiente de correlación entre distancias geográficas y distancias genéticas, resultó no significativo, ya que presentaron una diferenciación moderada tanto en las poblaciones más cercanas de 18.3 Km entre El Refugio y Masatepe ($\Phi_{ST}=0.093$), distancias similares de 122.8 Km y 122.6 Km entre Masatepe y Casita ($\Phi_{ST}=0.154$) y Trinidad y El Refugio ($\Phi_{ST}=0.152$) y en las más distantes de 139.9 Km entre El Refugio y Casita ($\Phi_{ST}=0.197$), fue la única con una diferenciación grande.

Todos los valores Φ_{ST} resultaron moderados independientemente de la distancia geográfica entre ellos. El menor valor de diferenciación entre pares de poblaciones ($\Phi_{ST}=0.062$) se presenta entre Masatepe y Esquipulas que están a una distancia geográfica de 97.8 Km y el mayor valor ($\Phi_{ST} =0.241$) es entre La Trinidad y El Casita con una distancia de 83.1 Km (Tabla 1 y 10). Estos resultados se analizan al discutir el dendrograma obtenido en las relaciones filogenéticas.

Muchos autores sostienen que la mayor parte de la variación molecular es selectivamente neutral o casi neutral y que los patrones observados de diferenciación entre poblaciones de la misma especie pueden estar determinados por la interacción entre migración-deriva genética a como citan los autores Moritz y Hillis, 1996; Hamrick y Godt, 1989, respectivamente.



5.5.4. RELACIONES FILOGENÉTICAS

Los resultados de agrupamientos por poblaciones y no por individuos de mayor o menor proximidad genética entre las cinco poblaciones de *C. odorata* se representan gráficamente en el dendrograma (Figura 6), realizado a partir de la matriz de distancias genéticas de Reynolds et al., (1983) (Tabla 11). Esta distancia es una medida apropiada para estimar la divergencia entre poblaciones debida exclusivamente a la deriva genética.

Tabla 11. Matriz de distancias genéticas de Reynolds et al., (1983), obtenidas a partir de RAPD

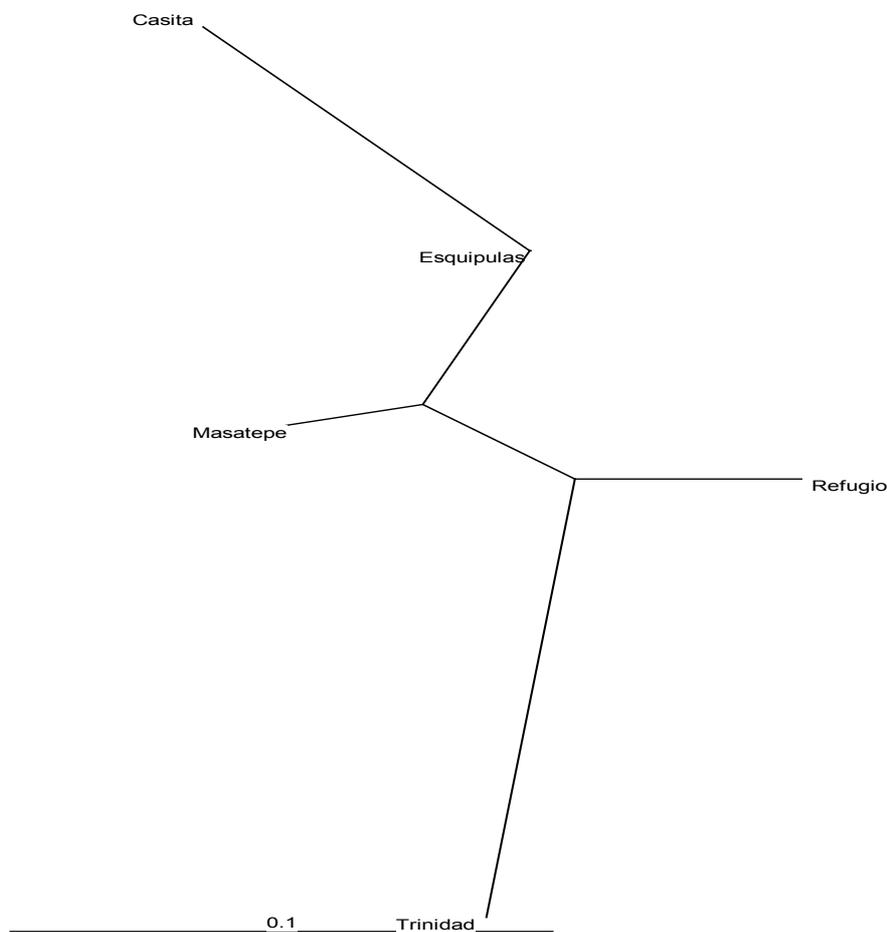
	CAS	ESQ	MAS	REF	TRI
Casita (CAS)	*				
Esquipulas (ESQ)	0.084	*			
Masatepe (MAS)	0.168	0.062	*		
El Refugio (REF)	0.220	0.123	0.098	*	
La Trinidad (TRI)	0.275	0.208	0.190	0.165	*

En el dendrograma se distingue un grupo formado por las poblaciones de Volcán Casita, El Refugio, Masatepe y Esquipulas y de manera aislada se presenta la población de La Trinidad.

Las poblaciones que formaron el grupo fueron las que presentaron baja distancia genética: Masatepe- Esquipula= 0.062, Esquipula-El Casita=0.084 y El Refugio y Masatepe=0.098. En el caso de El refugio y Masatepe, aunque no tengan el valor más bajo, son las poblaciones dentro de este grupo que tienen la menor distancia geográfica (18 Km). Estos bajos valores de distancia genética podrían indicar que aún existe flujo de genes entre estas cuatro poblaciones, las que pueden estar conectadas por árboles aislados y esparcidos entre ellas a través de los polinizadores.



Por el contrario, La Trinidad que es la población que se presentó aislada en el dendrograma, fue la que mostró la mayores distancias genéticas, como en el caso de La Trinidad-Esquipulas=0.208 y Trinidad-El Casita=0.275, a pesar de no tener La Trinidad la mayores distancia geográfica con las poblaciones de Esquipulas y El Casita. Esto se podría explicar, a que las distancias genéticas entre estas poblaciones se deben a la deriva genética, ya que al estar tan fragmentadas van quedando aisladas y se fijan alelos por el azar, diferenciándose así los alelos de una población a otra.



Matriz de correlación cofenética $r = 0.993$

Figura 6. Análisis Neighbour-joining mostrando las relaciones genéticas de 5 poblaciones de *Cedreia odorata* utilizando marcadores RAPDs.



El valor del coeficiente de correlación de Mantel entre la matriz original y la cofenética (r) del dendrograma fue de 0.993 ($P=0.9937$). Los valores del coeficiente de correlación cofenética pueden ser interpretados por el ajuste entre el dendrograma y la matriz original de la siguiente manera: (Zambrano et al. 2003).

- Mayor de 0.9 = muy bueno
- 0.9 a 0.8 = bueno
- 0.8 a 0.7 = pobres
- Menores de 0.7 = muy pobre

Por lo que se considera que el dendrograma obtenido tiene un ajuste muy bueno comparado con la matriz original.

El análisis de correlación entre las distancias genéticas de Reynolds y las distancias geográficas, resultó con un bajo coeficiente de correlación de $r= 0.090$ ($P<0.001$) que indica que no hay correlación estadísticamente significativa entre estas distancias. Esto podría sugerir que la distribución de las poblaciones indican divergencia del patrón neutral de aislamiento por distancia (Cavers et al. 2003b).

En el estudio de Cavers et al. (2003b), con el ADN de cloroplasto en poblaciones Mesoamericana de *C. odorata*, donde sugieren que *C. odorata* colonizó Mesoamérica de poblaciones originadas en Suramérica, dos de las poblaciones utilizadas en nuestro estudio Masatepe y La Trinidad fueron filogeográficamente agrupadas junto con otras dos poblaciones nicaragüenses (Ometepe y Wabule), en un solo haplotipo con las poblaciones de Honduras y el noroeste de Costa Rica, reuniéndolas como un linaje de haplotipo denominado "Central".



De continuar las fragmentaciones de las poblaciones naturales de *Cedreia odorata* L., de Nicaragua, como se pudo constatar durante las giras de colecta, donde prácticamente existen solo remanentes de árboles, esto podría afectar la fertilidad de esta especie ya que los aislamientos evitarían que los polinizadores puedan volar entre ellas. Esto reduce el flujo de genes, elevando la endogamia y depresión de endogamia, lo que podría tener serias consecuencias sobre el fitness de las poblaciones. También el cambio climático puede considerarse como una posible amenaza para la especie, por ejemplo cambios en la temperatura puede afectar el comportamiento de los polinizadores o incrementar la frecuencia de los incendios. (Hernández, 2008).



VI

Conclusiones



Las conclusiones de los resultados obtenidos del presente estudio para determinar la diversidad genética en cinco poblaciones naturales de *C. odorata* de Nicaragua, son las siguientes:

- Con 9 cebadores seleccionados para los análisis RAPDs, se generó un 72% de bandas polimórficas en las 92 muestras de 5 poblaciones de *C. odorata*. La proporción de bandas polimórficas de todos los cebadores con todas las poblaciones dio un valor medio de 63.33%.
- Los valores medios para medir la diversidad intrapoblacional fueron similares tanto de la diversidad fenotípica ($H_f=0.339$) como génica ($H_g=0.311$). El menor valor de diversidad fenotípica y génica la presentaron El Refugio y Esquipulas respectivamente y La Trinidad el mayor valor en ambos.
- Se encontró una mayor variación genética de *C. odorata* intrapoblacional que interpoblacional. Los valores estimados dentro de las poblaciones fueron altos (93.1% para diversidad genotípica y 86.19% según AMOVA) y bajos entre poblaciones (6.9% para diversidad génica 0.069 y 13.8% según AMOVA).
- El grado de diferenciación entre las poblaciones de *C. odorata* ($\Phi_{ST}=0.138$) fue moderada según Wright. También los valores Φ_{ST} entre los pares de poblaciones resultaron moderados independientemente de la distancia geográfica entre ellos.
- En el dendrograma obtenido por el método de neighbor-joining se distingue un grupo central formado por las poblaciones del Volcán Casita, El Refugio, Masatepe y Esquipulas. Y de manera aislada se presenta la población de La Trinidad. El análisis de correlación entre la distancias genética de Reynolds y la Distancia Geográfica indicó que no hay correlación estadísticamente significativa entre estas distancias.



VII

Recomendaciones



Los resultados obtenidos en el presente estudio para determinar la diversidad genética en cinco poblaciones naturales de *Cedrela odorata* de Nicaragua, utilizando marcadores RAPDs permiten hacer las siguientes recomendaciones:

- Ampliar este estudio con las poblaciones no muestreadas de *Cedrela odorata* L. y que incluyan tanto las regiones del Pacífico como del Atlántico, para obtener el rango total de la diversidad presente en nuestro país. Los resultados obtenidos deberían ser usados para considerar estrategias de conservación-reforestación.

- Que el INAFOR a través del CMG&BSF promueva estudios de variabilidad genética en árboles plus de *Cedrela odorata* L. seleccionados de las poblaciones naturales de Nicaragua, para ser utilizados en futuros ensayos de progenie en programas de mejoramiento genético.

- Promover estudios cooperativos entre diversas instituciones forestales de Latinoamérica, que permitan ampliar la cobertura de este tipo de estudio en la especie, a lo largo de su distribución natural.

- Utilizar este tipo de estudio en la búsqueda y selección de genotipos de *Cedrela odorata* L. resistentes al ataque de *Hypsipyla*, para luego promover estos genotipos como una medida práctica y eficaz en la lucha contra esta plaga.



VIII

Bibliografía



ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. y WATSON, J.D. 1996. Biología Molecular de la Célula. Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 1387 p.

AUDESIRK, T.; AUDESIRK, G.; BYERS, B. E.; ESCALONA, H. J. y ESCALONA, R. L. 2003. Biología: La vida en la tierra. Pearson Educación. México. 889 p.

BIRD, L. y MONELLI, J. 2001. La biodiversidad (en línea). Consultado 23 de noviembre de 2008. Disponible en <http://www.alianzageografica.org/leccionbiodiversidad.pdf>.

CAMPBELL, N.A.; MITCHELL, L.G. y REECE, J.B. 2001. Biología: Conceptos y Relaciones. Tercera Edición. Editorial. Pearson Educación. Prentice Hall. México, D.F. (en línea). Consultado: 25 de enero de 2009. Disponible en <http://books.google.com.ni/books>.

CAVERS, S.; NAVARRO, C. and LOWE A.J. 2003a. A combination of molecular markers identifies evolutionarily significant units in *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) in Costa Rica. *Conservation Genetics* 4 (5): 571-580 p.

CAVERS, S.; NAVARRO, C. and LOWE, A.J. 2003b. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Conservation Genetics* 4: 571–580.

CERDA, D. 2007. Evaluación de la Diversidad Genética de Poblaciones Naturales de *Pinus tecunumanni* Eguluz & J.P. Perry de Nicaragua Mediante el Uso de Marcadores RAPDs. Monografía, Licenciatura. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 125 p

CHALMERS, K.J.; NEWTON, A.C.; WAUGH, R.; WILSON, J. and POWELL, W., 1994. Evaluation of the extent of genetic variation in mahoganies (Meliaceae) using RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 89(4): 504–508.

CINTRÓN B. 1990. *Cedrela odorata* L. Cedro spanish-cedar. 1990. (en línea). Consultado 10 de octubre de 2008. Disponible en <http://www.fs.fed.us/global/iitf/Cedrelaodorata.pdf>.



CLARO DÍAZ, M. G. sf. Marcadores Moleculares. Qué son, cómo se obtienen y para qué valen?. (en línea). Consultado 2 de febrero de 2009. Disponible en <http://www.encuentros.uma.es/encuentrosya/marcadores.htm>

CONVENCIÓN SOBRE EL COMERCIO INTERNACIONAL DE ESPECIES AMENAZADAS DE FAUNA Y FLORA SILVESTRES (2006. Lima, Perú). 2006. Propuestas De Enmienda A Los Apéndices Para Las Especies Arbóreas: Decimosexta reunión del Comité de Flor. Lima, Perú (en línea). Consultado 4 de mayo de 2009. Disponible en <http://www.cites.org/esp/com/PC/16/S-PC16-19-02.pdf>.

CURTIS, H. y BARNES, N. S. 2000. Biología. Sexta edición. Editorial Médica Panamericana. S.A. 1496 p.

De la TORRE, A.; LÓPEZ, C.; YGLESIAS, E. and CORNELIUS, J. 2008. Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedreia odorata* populations in Madre de Dios, souther Amazon. *Forest Ecology and Management* 255:334-339.

DÍAZ, V. and FERRER, E. 2003. Genetic variation of populations of *Pinus oocarpa* revealed by resistance gene analog polymorphism (RGAP). *Genome* 46: 404-410.

DÍAZ, VARGAS V. 2001. Caracterización de la Diversidad Genética de Poblaciones Naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua a través de Marcadores Moleculares. Tesis doctoral. Alcalá, España. Universidad de Alcalá de Henares. 127 p.

DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L. y VALENTINE J.W. 1993. Evolución. Ediciones Omega, S. A. Barcelona, España. 528 p.

ENRECH, X. 2000. Una década de Aplicación del Método RAPD: Alcances y limites en el estudio de relaciones genéticas en plantas. 2000. *Acta Científica Venezolana* 51: 197–206.



EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; and SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.01: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

FELSENSTEIN, J. 2004. Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.65. Department of Genome Sciences and Department of Biology. University of Washington, USA.

FONTDEVILA, A. and MOYA, A. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Editorial Síntesis. Madrid, España. Síntesis. 349 p.

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

GAUER, L. and CAVALLI-MOLINA, S. 2000. Genetic variation in natural populations of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. –Hill. Aquifoliaceae) using RAPD markers. *Heredity* 84: 647-656.

GILLIES, A., NAVARRO, C. Y HERNÁNDEZ, M., (1995a). First Anual Scientific Report: Assesment of genetic diversity of economically and ecologically important tree species of Central América and the Caribbean: Implications for conservation, sustainable utilization and management. CATIE-ITE.

GILLIES, A.C.M; CORNELIUS, J.P.; NEWTON, A.C.; NAVARRO, C. and HERNÁNDEZ, M. (1997b). Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L., assessed using RAPDs. *Molecular Ecology* 6:1133-1145.

GBIF (GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY). 2007. Names and classification (en línea). Consultado 24 de septiembre de 2008. Disponible en <http://www.gbif.org>.

HAMRICK, J.L. and GODT, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant especies. En: Ed. K Urbanski. *Differentiation Patterns in Higher Plantas*. NY, U.S. Academic Press.



HERNÁNDEZ, L. 2008. Genetic diversity and mating system analysis of *Cedrela odorata* L. (Meliaceae) populations under different human dominated landscapes and primary forests. Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado. CATIE. 74 p.

HUFF, D.R.; PEAKALL, R. and SMOUSE, P.E. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchloë dactyloides* (Nutt.) Engelm]. Theoretical and Applied Genetics 86:927-934.

IPGRI y CORNELL UNIVERSITY. 2003. Tecnología de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje. Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (en línea). Consultado 23 de octubre de 2008. Disponible en http://www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.3.pdf.

KHASA, P.D. and DANKIK, B.P. 1996. Rapid identification of white- Engelmann spruce species by RAPD markers. Theor Appl Genetics 92:46-52.

KERNODLE, S.P.; CANNON, R.E. and SCANDALIOS, J.C. 1993. Concentration of Primer and Template Qualitatively Affects Products in Random – Amplified Polymorphic DNA PCR. BioTechniques 14(3): 363-364.

KLEIN-LANKHORST, R.M.; VERMUT, A.; WEIDE, R.; LIHARSKA, T. and ZABEL, P. 1991. Isolation of molecular markers for tomato (*L. esculentum*) using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Theor Appl Genet 83:108-114.

LINDO, E. 2007. Validación de una medida cultural y uso de Micorriza para el manejo integrado de plagas de Cedro y la Caoba, CMG&BSF, 2006-2007. Monografía, Licenciatura. León, Nicaragua. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. 66 p.

LOO, A.H.; TAN, H.T.W.; KUMAR, P.P. and SAW, G.L. 1999. Population Analysis of *Licuala glabra* Griff. Var. *glabra* (Palmae) using RAPD Profiling. Annals of Botany 84: 421 – 427.



MAGNI, C. 2005. Principios de genética de poblaciones: Introducción, conceptos básicos y herramientas de medición de la diversidad genética (en línea). Consultado 17 de febrero de 2009. Disponible en <http://www.veterinaria.uchile.cl/genetica/cons2005/cmagni1.pps>.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.

MILLER, M.P. 1997. Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) Version 1.3. A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

MÖLLER, E.M.; BAHNWEG, G.; SANDERMANN, H. and GEIGER, H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit, bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acid Research* 20: 6115 – 6116.

MORITZ, C. and HILLIS, D.M. 1996. The evolution of molecular systematics. En: Eds. DM Hillis; C Moritz; B K Mable. *Molecular systematics*. 2 ed. Sunderland, Mass,US. Sinauer Associates.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA.

NYBOM, H. AND BARTISH, I.V. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution, and Systematics*: 3:93-114.

PAGE, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12: 357-358.



PICCA, A.; HELGUERA, M.; SALOMÓN, N. y CARRERA, A. 2004. Marcadores moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal (en línea) Consultado 2 de febrero de 2009. Disponible en http://argenbio.org/adc/uploads/libro/09_II_4.pdf.

PATÍÑO, F. 1997. Recursos Genéticos de *Swietenia* y *Cedrela* en los neotropicos (en línea). Consultado 17 de enero de 2009. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/AD111S/AD111S00.htm#TOC>

PANIAGUA, A. s.f. Los impactos sobre la gobernabilidad y la pobreza. La Producción Forestal no Controlada en Honduras y Nicaragua. REMBLAH-FEHCAFOR-NICAMBIENTAL-ODI-FAO. 40 p.

POMMIER, s.f. Barriers to legal compliance and good governance in the forestry sector, and impacts on the poor in Nicaragua. Policy Brief. (en línea). Consultado 19 de junio de 2009. Disponible en <http://www.talailegal-centroamerica.org>

POVH, J.; LOPERA, N.; RIBEIRO, R.; LUPCHINSKI, J.R.E.; GOMES, P. y LOPES, T. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. Ciencia e Investigación Agraria 35(1): 5-15.

PUERTAS, M. 1999. Genética: Fundamentos y perspectivas. Segunda Edición. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid, España. 913 p.

REYNOLDS, J; WEIR, B.S.; and COCKERHAM, C.C. 1983. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for short term genetic distance. Genetics 105: 767-779.

RODRÍGUEZ, P. y BARRERA, H. 2004. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL 7(3):323-335.

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



SALOMON, E.P.; BERG, L.R.; MARTIN, D.W. y VILLEE, C. 1993. Biología: De Villee. Tercera Edición. Nueva Editorial Interamericana, S.A. de C.V. 383 p.

SAITOU, N. and NEI, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

SATZ, L. y KORNBLIHTT, A. 1993. LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA. El método y sus aplicaciones. *Ciencia Hoy*. Vol. 4 N° 23 (en línea). Consultada 16 de febrero de 2009. Disponible en <http://www.cienciahoy.org.ar/hoy23/reaccion.htm>.

SNEATH, PHA; SOKAL, RR. 1973. Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classifications. San Francisco, US, Freeman.

SOLÍS, L.Y. y ANDRADE TORRES, A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares?. *La Ciencia y El Hombre*. Vol. 18 No. 1 (en línea). Consultado 9 de Mayo 2008. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>.

SPOONER, D.; VAN TREUREN, R. and DE VICENTE, M.C. 2005. Molecular Markers for Genebank Management. IPGRI Technical Bulletin N° 10. Rome, Italy. 126 p.

STEVENS, W.D. 2001. Flora de Nicaragua. Missouri Botanical Garden Press. St. Louis, Missouri (en línea) Consultado 10 de marzo de 2008. Disponible en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/nicaragua/welcome.shtml>.

WILLIAMS, J. G.K.; KUBELIK, A. R., LIVAK, K. J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18(22):6531-6535.

WHITKUS, R.; DOEBLEY, J. and WENDEL, J.F. 1994. DNA – based markers in plants. Editorial Dower. Holanda. 141 p.



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

VERGARA, A. Aproximación hacia un Manejo Integrado del barrenador de las Meliaceas, *Hypsipyla grandella* (Zeller) 1997. Revista Forestal Venezolana 41(1):23-28

ZAMBRANO, A.; DEMEY, J.R.; FUENMAYOR, F.; SEGOVIA, V.; and GUTIÉRREZ, Z. 2003. Diversidad Genética de una Colección de Yuca a través de Marcadores Moleculares RAPDs. Agronomía Tropical 53(2): 157-173.